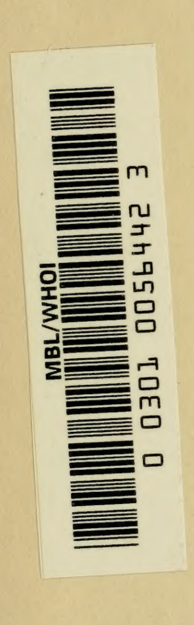

MBL/WHOI
3 0301 0056442 3

1er CONGRÈS INTERNATIONAL D'HISTOCHIMIE ET DE CYTOCHIMIE

1st INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY

PARIS

28 Août – 3 Septembre 1960

28 August – 3 September 1960

RÉSUMÉS – ABSTRACTS

NOUVELLE FACULTÉ de MÉDECINE

45 Rue des Saints Pères – Paris Ve

Published for the Organizers of the Conference by

PERGAMON PRESS

OXFORD LONDON NEW YORK PARIS



Printed in Poland
to the order of Państwowe Wydawnictwo Naukowe Warszawa
by Zakład Graficzny PWN Łódź

Manuscript received 20 June 1960
Printing completed 10 August 1960

Contents

Table des matières

SECTION V. LIPIDES ET DÉRIVÉS D'OXYDATION

SECTION VI. DÉSHYDROGÉNASES ET TRANSFERTS D'HYDROGÈNE

SECTION VII. PHOSPHATASES

SECTION VIII. CATÉCHOLAMINES, INDOLS ET PHÉNOLS

SECTION IX. HISTOCHIMIE INORGANIQUE

SECTION X. NON CLASSÉS DIVERS

HISTOCHIMIE APPLIQUÉE

SECTION I. TISSU CONJONCTIF

SECTION II. HISTOCHIMIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE NON TUMORALE

SECTION III. HISTOCHIMIE DU CANCER

SECTION IV. PEAU ET GLANDES CUTANÉES

SECTION V. HISTOCHIMIE DU SYSTÈME NERVEUX

SECTION VI. HISTOCHIMIE DE LA DENT

SECTION VII. HISTOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE

SECTION VIII. HISTOCHIMIE VÉGÉTALE

SECTION IX. HISTOCHIMIE ET EMBRYOLOGIE

SECTION X. TRACTUS GÉNITAL

Index

PROBLÈMES PHYSIQUES

II. APPLICATION TO LOCALIZATION OF ENZYMES AND OTHER CHEMICALS

JEFFREY P. CHANG and SAMUEL H. HORI

Section of Experimental Pathology, Department of Pathology,
The University of Texas M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute,
Houston, Texas, U.S.A.

The application of the section freeze-substitution technique to the localization of enzymes and other substances in tissues is reported. The following have been readily and precisely demonstrated in frozen-substituted tissues: oxidative enzymes, such as DPNH and TPNH diaphorases, succinic dehydrogenase and choline dehydrogenase; hydrolytic enzymes, such as alkaline and acid phosphatases, esterase, 5'-nucleotidase, amylophosphorylase, and beta-glucuronidase; and chemical substances other than enzymes, such as nucleic acids, carbohydrates, proteins and amino acids, inorganic elements, and soluble isotopes. The section freeze-substitution technique appears to be a most versatile and reliable histochemical procedure. Studies are currently being conducted to demonstrate its fullest usefulness.

CYTOCHEMISTRY WITH THE ELECTRON MICROSCOPE ON FREEZE DRIED TISSUES

BENJAMIN W. GRUNBAUM

Department of Pediatrics and Cancer Research Institute,
University of California Medical Center, San Francisco 22,
California

THE PRESERVATION OF CYTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL DETAIL BY CONTROLLED TEMPERATURE FREEZE-DRYING

G. J. CUNNINGHAM, LUCILLE BITENSKY, J. CHAYEN
and A. A. SILCOX

**Department of Pathology, Royal College of Surgeons,
Lincoln's Inn Fields, London.**

The basis of all histochemistry is the perfect preservation of all components of the tissue. The technique by which cells are frozen, dried and then sectioned has certain drawbacks, which will be discussed. A method will be described by which tissue is frozen relatively slowly to –70°C and sectioned at –20 to –25°C. The cytological preservation is such that half an hour after injecting a liver carcinogen its effect on the structure of liver mitochondria can be observed. The distribution of enzymes such as alkaline phosphatase or dehydrogenases and enzymatic metabolism of a carcinogenic agent have been studied without prior fixation, the sections being treated very much as are the tissue slices used by biochemists. The localization of lipids is demonstrable readily; in particular delicate lipid-protein bonds are unaffected by this preparatory procedure. Molecular orientation too is well preserved. This is shown best in plant cells for which no critical preparatory method has been available previously.

"FREEZE-SUBSTITUTION" MÉTHODES POUR LA PRÉSERVATION DES STRUCTURES INTRACELLULARES ET DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES OU ANTIGÉNIQUES

L. ORNSTEIN, B. J. DAVIS, P. TALEPOROS et S. KOULISH

The Mount Sinai Hospital, New York City, U.S.A.
(Le papier sera présenté par le Docteur Leonard Ornstein)

Préparées avec soin par "Freezing-drying" ou par "Freezing-substitution", des coupes de tissu montrent une préservation remarquable de détails intracellulaires dans les couches externes de cellules, *à condition qu'elles n'aient pas été en contact avec* de l'eau avant de les étudier. (La cellule vivante, vue à travers une grande ouverture dans un microscope à contraste de phase, est employée comme cadre de référence morphologique.)

Le traitement de telles cellules *sèches*, bien préservées, avec certains réactifs anhydres, stabilise les protéines de sorte qu'une exposition des milieux ultérieure à l'eau ne détruira pas la structure délicate.

L'exposition des tissus secs aux réactifs tels que l'OsO_4 à 2%, le Cl_2Hg à 5% ou l'acide ATC dans des solvants anhydres tels que l'acétone, la diméthylformamide et certains alcools, à basse température (–15 à –75°C), aboutit à des différences assez grandes des vitesses d'insolubilisation de plusieurs protéines, comparées avec la vitesse d'inactivation de l'activité de leurs sites enzymatiques et antigéniques, tels que les deux procédés peuvent être facilement separés; la fixation précède l'inactivation.

La "Freeze-substitution" est suivie tout d'abord d'un temps bien contrôlé de fixation à basse témperature avec les réactifs indiqués et ensuite d'un enrobage et de fabrication de coupes par les moyens habituels, au niveau des coupes on note une préservation excellente de la morphologie des tissus et une activité àssez abondante des enzymes et des substances antigéniques.

Des microphotographies des hydrolases cellulaires et des coupes traitées par la technique de Coons seront démontrées.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES CELLULES ENTÉROCHROMAFFINES SELON LA TECHNIQUE DE CONGÉLATION–DESSICATION

FULVIO GHIRINGHELLI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

Nous avons utilisé la technique de congélation-dessication pour étudier les cellules entérochromaffines (C.e.) typiques du duodénum de cobaye. Nous avons pris en considération certaines caractéristiques histophysiques et histochimiques de ces cellules. Les résultats obtenus à l'aide de la méthode susdite sont les suivants:

a) les c.e. du matériel non fixé ne présentent, dans les coupes simplement déparaffinées avec le xylol, le benzol, le chloroforme ou le nonane, ni leur couleur propre, ni fluorescence appréciable à la lumière de Wood;

b) l'exposition de coupes paraffinées libres ou de coupes adhérentes à la lamelle et déparaffinées avec le nonane, aux vapeurs de formaldéhyde, détermine à brève échéance (environ 2 heures) l'apparition de la fluorescence jaune typique des C.e. et permet une excellente fixation du tissu;

c) la post-fixation aux vapeurs de formaldéhyde permet la réussite des différentes techniques adoptées d'habitude pour reconnaître les c.e. (Masson-Hamperl, Schmorl, Gibbs, diazoréaction alcaline, etc.);

d) un traitement à l'alcool éthylique absolu, à l'acétone absolu, aux vapeurs d'alcool éthylique absolu, précédant la post-fixation aux vapeurs de formaldéhyde, empêche la démonstration histochimique des c.e.;

e) l'exposition de coupes libres paraffinées, pendant 24 heures, aux vapeurs d'acide osmique à 2%, ou pendant une demi-heure aux vapeurs d'iode métallique, détermine dans le premier cas un noircissement et dans le second cas un brunissement des granulations des c.e. Si l'on fait précedér aux vapeurs d'acide osmique ou d'iode, la fixation aux vapeurs de formaldéhyde, on obtient une atténuation nette de la réactivité des cellules.

RADIOAUTOGRAPHY AS A HISTOCHEMICAL TOOL

C. P. LEBLOND, BEATRIX KOPRIWA and B. MESSIER

Department of Anatomy, McGill University
Montreal, Canada

ON THE ROLE OF THE CELL NUCLEUS AND ITS FRACTIONS IN PROTEIN BIOSYNTHESIS AS EVIDENCED FROM INCORPORATION OF LABELED AMINO ACIDS

I. B. ZBARSKY and K. A. PEREVOSCHIKOVA

Biochemical Laboratory, State Oncological Institute
Moscow, USSR

Lebelled amino acids (glycine-C^{14}, lysine-C^{14}, methione-S^{35}) injected into rats or mice, incorporate into nuclear proteins of liver spleen and other normal tissue cells only slightly less intensively than into the whole tissue proteins. The highest rate of radioactivity incorporation among nuclear proteins was found to be in the "acid protein" fraction which represents the ribonucleoproteins of nucleoli. The deoxyribonucleoprotein fraction is less active, while the residual protein forming nuclear membrane shows the least activity.

Tumor cell nuclei show much lower incorporation and differ from normal cell nuclei in distribution of radioactivity among nuclear fractions. There was a difference from the normal pattern in regenerating rat liver after partial hepatectomy.

The incorporation of labeled amino acids into proteins and an increase in protein nitrogen were observed also on the isolated nuclei of calf thymus and transplanted rat sarcoma "M_1" incubated *in vitro* with a mixture of amino acids and a factor produced by mitochondria.

On the basis of the results presented it may be concluded that cell nuclei produce mostly specific proteins and nucleoproteins, determing normal cellular development and differentiation.

NUCLEIC ACID METABOLISM IN REGENERATING RAT LIVER USING CYTIDINE–H^3*

RUTH G. KLEINFELD and E. von HAAM

Department of Pathology, Ohio State University,
Columbus, Ohio

A study was made of RNA and DNA synthesis in rat liver parenchymal cells following 65–70% partial hepatectomy. Male Wistar rats weighing 80–100 gm were given cytidine-H^3 (200 μc per rat intraperitoneally) 18 hours following surgery. Animals were sacrificed in pairs (one laparotomized and one partially hepatectomized) at ½, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, and 24 hours following isotope injection. Sections 2 μ thick were subjected to differential extraction techniques making it possible to distinguish between cytidine incorporation into RNA and DNA.

In the 18-hour regenerating rat liver, approximately 50% of parenchymal cells in the periportal regions of the lobule were synthesizing DNA in contrast to 5% in the centrolobular regions. The period from the end of DNA synthesis to the onset of mitosis (G_2 time) was approximately 4 hours.

A difference in the time course of incorporation of cytidine-H^3 into nucleolar RNA was found in the periportal versus the centrolobular cells. Two RNA fractions having different metabolic properties were indicated in both nucleoli and chromatin. Nucleolar RNA synthesis was found to occur in nuclei during the process of DNA synthesis.

---

*Supported by U.S.P.H.S. Grant No. C-4077 and a grant from The American Cancer Society.

RECHERCHE AUTORADIOGRAPHIQUE COMPARÉE DU MÉTABOLISME PROTIDIQUE DU NUCLÉOLE, DU NOYAU ET DU CYTOPLASME DANS DES CELLULES GERMINATIVES ET SOMATIQUES

W. ERB und K. HEMPEL

Institut f. Medizinische Isotopenforschung
der Universität Köln

A l'aide d'acides aminés marqués par H-3, C-14, et S-35 on a fait des recherches autoradiographiques avec la technique du stripping film et de l'émulsion liquide au niveau du métabolisme protidique à l'intérieur des structures cellulaires des cellules germinatives animales et végétales (*Psammechinus miliaris*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*) et des cellules somatiques (souris, rat, lapin).

La distribution de la densité des grains d'argent dans les autoradiogrammes de différentes cellules était indépendante de l'acide aminé marqué choisi. Les autoradiogrammes sont donc caractéristiques par l'intensité du métabolisme protéique à l'intérieur des structures cellulaires.

La plus forte incorporation d'acide aminé dans les oocytes examinés s'est manifestée à l'intérieur du nocléole. Elle était beaucoup moins forte dans le reste du noyau.

Dans les cellules somatiques examinées on ne trouvait pas d'incorporation d'acide aminé au niveau du nucléole. Elle a plutôt lieu dans le noyau, liée à la chromatine du noyau. Cette incorporation est particulièrement intense dans l'entourage du nucléole et surtout au niveau de la chromatine associée au nucléole.

Le comportement différent des oocytes et des cellules somatiques doit être discuté et comparé avec les résultats semblables donnés par d'autres travaux scientifiques.

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DU MÉTABOLISME DES PROTÉINES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES DES CELLULES DU CARTILAGE ET DE L'OS

E. KOBURG

Institut f. Medizinische Isotopenforschung
der Universität Köln

L'intensité du métabolisme de la protéine des cellules des tissus conjonctifs, surtout des cellules du cartilage et de l'os (chondrocytes, ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) a été examinée par la méthode de l'autoradiographie (stripping-film AR 10 et émulsion liquide G5). Des souris, des rats, des cobayes, des lapins et des colombes ont servi pour ces recherches, réalisées à l'aide des acides aminés marqués à l'H–3, au S–35 et au C–14.

Après l'emploi de différents acides aminés marqués les autoradiogrammes ont montré la même distribution des grains d'argent. En conséquence, les autoradiogrammes reflètent l'intensité du métabolisme des protéines.

Les résultats montrent que les ostéoblastes ont un métabolisme des protéines très grand. Ces cellules appartiennent, comme les cellules nerveuses, l'épithélium de pancréas etc. à celles qui, dans l'organisme, ont le métabolisme des protéines le plus grand.

Le métabolisme de la protéine est un peu plus petit dans les cellules de cartilage prolifère, des jeunes ostéocytes et des ostéoclastes.

Les cellules de cartilage articulatoire et trachéale et les ostéocytes situés dans l'os compact montrent un métabolisme des protéines très petit.

En déterminant la densité des grains d'argent, il est possible d'apprécier l'intensité du métabolisme de la protéine dans les différentes cellules. Ces résultats sont comparés avec les situations dans le reste de l'organisme.

En ce que concerne le métabolisme ADN (H–3–Thymidine) et le métabolisme ARN (H–3–Cytidine, H–3–Uridine) des cellules des os et du cartilage, des résultats autoradiographiques seront communiqués.

RECHERCHES AUTORADIOGRAPHIQUES SUR LE MÉTABOLISME DES PROTÉINES DANS LES DIFFÉRENTS TISSUS DE LA COCHLÉE

D. PLESTER, E. COBURG et K. HEMPEL

Le niveau du métabolisme des protéines des différents tissus et des éléments cellulaires de la cochlée a été déterminé par autoradiographie après administration de leucine marquée.

L'imprégnation la plus importante par la leucine a eu lieu au niveau des cellules du ganglion spiral de la cochlée, un peu moins au niveau de la stria vascularis. L'importante fixation de cette protéine dans ce tissu confirme l'opinion selon laquelle la stria vascularis possède une certaine fonction secrétoire. Nous avons obtenu les mêmes résultats dans le corps ciliaire de l'oeil et dans le plexus choroïdien.

En outre la membrane de Reissner dont le rôle n'est pas encore bien connu, présente aussi un niveau métabolique assez élevé. On peut penser que le métabolisme élevé au niveau de la membrane contribue au maintien de la grande différence de potentiel électrique entre les espaces endo- et périlymphatiques.

Les cellules sensorielles de l'organe Corti ainsi que les cellules de soutien présentent un métabolisme très bas (environ 50 fois plus faible que celui des cellules du ganglion spiral de la cochlée).

Nous avons pu faire des constatations comparables pour la rétine. Dans la membrana tectoria nous n'avons pas pu déceler de métabolisme protidique.

En somme, le métabolisme des protéines observé grâce à la leucine marquée dans les tissus et les cellules de la cochlée montre un parallélisme intéressant avec celui des tissus et des cellules de l'oeil et des autres tissus de l'organisme.

THE APLICATION OF DIRECT TRITIUM-LABELLING METHODS TO THE CYTOCHEMISTRY OF PROTEINS

E. A. BARNARD and J. MARBROOK

Department of Zoology, University of London King's College,
Strand, London W.C.2.

Isotopic labels can be employed with advantage in directly-applied cytochemical reagents forming covalent bonds at sites in proteins and other macromolecules. The difficulties of introducing sufficient light-absorbing structures, and the related problems of micro-spectrophotometry, can be avoided here. These methods must be distinguished from those in which the isotope is introduced metabolically prior to fixation, and also from those in which a labelled enzymic reaction product is adsorbed.

We have examined the application of small tritiated reagent molecules to the quantitative cytochemistry of protein groups. High resolution, and ample labelling after very short exposures, are obtained thus with tritium. The factors involved in obtaining accurate quantitative results with such reagents have been examined. While comparative measurements can be made readily, absolute measurements can also be obtained but only after calibration of each system investigated.

Measurements have been made on the total number of groups available to acylation, and on the amino groups of proteins in various situations. Comparison with micro-spectrophotometric measurements using colour-forming reagents can give valuable calibrations of the latter methods.

The similar use of tritiated groups in labelling anti-bodies for cytochemical application, e.g. for enzyme localisations, will also be discussed.

LE VOLUME DU NOYAU D'UNE CELLULE COMME SIGNE DE SON ACTIVITÉ SYNTHÉTIQUE

(Étude autoradiographique de l'incorporation de H-3-Leucine et de C-14-acides aminés pour différents types de cellules chez le rat)

W. OEHLERT* und B. SCHULTZE**

L'incorporation de H^3-Leucine et de C^{14} acides aminés dans les différents organes du rat a été examiné par la méthode autoradiographique. Au-dessus des noyaux de 26 différents types des cellules le nombre moyen des grains d'argent par noyau fut compté. En même temps le volume des noyaux fut mesuré.

Les résultats montrent que la synthèse des protéines dans le noyau par unité de volume a presque la même valeur pour tous les types des noyaux examinés. L'intensité de la synthèse des protéines dans le noyau est donc proportionnelle au volume du noyau. Par exemple, l'incorporation des acides aminés dans les protéines du noyau est plus intense chez cerataines cellules ganglionnaires que chez les lymphocytes (follicule de rate). Avec la maturation des follicules de l'ovaire on observe une augmentation de l'incorporation des acides aminés dans les protéines du noyau, qui est proportionnelle au volume du noyau en croissance. La même proportionnalité se trouve dans les différences de volume des noyaux du foie.

Probablement l'hydratation d'un noyau a une importance essentielle pour son activité synthétique.

Les résultats confirment directement l'hypothèse que la croissance du noyau qui accompagne les différents accroissements fonctionnels ("Kernschwellung" et "Kernoedem") est le signe d'une augmentation de l'activité synthétique du noyau.

---

*Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
**Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln

LE MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES DES CHROMOSOMES GÉANTS DE DROSOPHILA MELANOGASTER*

GEORGE T. RUDKIN

The Institute for Cancer Research, Philadelphia 11,
Pennsylvania, U.S.A.

L'étude du métabolisme des acides nucléiques des chromosomes a été abordée par la comparaison, chez la Drosophile, de l'incorporation localisée de précurseurs marqués à l'aide du tritium, et de l'absorption des rayons ultraviolets dans les mêmes régions ou bien dans des régions homologues. On a injecté soit de la thymidine-H^3 soit de la cytidine-H^3 au stade larvaire terminal.Les animaux ont été disséqués à divers intervalles de temps, jusqu'à une durée maximum de 7 heures, moment où plusieurs d'entre eux se transformaient en larve. Les chromosomes de ceux-ci ont notamment des "pouffs" qui se forment et qui disparaissent en des régions caractéristiques. Les glandes salivaires ont été fixées à l'acide acétique 45% et des "squashes" préparés sur des lames de verre ou de quartz, recouvertes ensuite d'une couche d'émulsion autoradiographique. Nos résultats antérieurs ont démontré que la formation des "pouffs" se réalise indépendamment de l'incorporation de la thymidine, mais qu'elle est accompagnée d'une incorporation augmentée de la cytidine. Selon les données plus récentes sur l'absorption des ultraviolets, l'accroissement de la cytidine, lié à la formation des pouffs,peut s'expliquer par la teneur augmentée de l'ARN de ces régions, vu que l'activité de l'ARN (quantité de la cytidine-H^3 relative à l'absorption des ultraviolets) est égale dans les deux régions pouffs et non-pouffs. Les chromosomes marqués par l'injection de la cytidine-H^3 se présentent en deux catégories: l'une où les régions pouffs sont relativement fortement radioactives (plus de 90% des noyaux), et l'autre où le niveau de radioactivité est assez limité comme dans le cas de la thymidine-H^3 (moins de 10%). Ceci nous amène à penser que la synthèse de l'ARN des chromosomes manque ou se produit très peu au moment où l'ADN est en train d'être synthéthisé.

---

*Travail réalisé avec l'aide d'une subvention (C—1613) du "The National Cancer Institutes of Health", United States Public Health Service et une subvention institutionnelle du American Cancer Society, Inc.

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DU MÉTABOLISME DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS LES ORGANES ET DANS LES STRUCTURES DE LA CELLULE CHEZ LA SOURIS ET LE RAT

B. SCHULTZE* und W. OEHLERT**

Après l'injection de H^3-Uridine et de H^3-Cytidine le métabolisme de l'ARN a été examiné dans les organes et dans les structures de la cellule chez la souris et le rat par la méthode autoradiographique.

Les autoradiogrammes des différents organes après injection 1° des différents précurseurs de l'ARN et 2° des différents acides aminés marqués de H^3, S^{35} ou C^{14} montrent une distribution et un noircissement très semblables. Cela signifie qu'il existe une proportionalité non seulement entre la quantité de l'ARN d'une cellule et la synthèse de protéines (Caspersson, Brachet) mais aussi entre la synthèse de l'ARN et la synthèse de protéines. La signification de cette relation nouvelle sera discutée.

Après l'injection de H^3-Uridine et de H^3-Cytidine le nombre des grains d'argent au dessus du nucléole, du noyau et du cytoplasme chez différents types des cellules a été compté en fonction du temps entre injection et sacrifice des animaux (10 min–36 h). Quelques minutes après l'injection la densité des grains d'argent au-dessus du nucléole est considérablement plus grande qu'au-dessus de la chromatine du noyau. Plus tard on observe aussi des grains d'argent au-dessus du cytoplasme. Les courbes, donnant le nombre des grains d'argent en fonction du temps, montrent qu'il existe une synthèse de l'ARN dans le nucléole et aussi en connexion avec les structures de la chromatine du noyau. La synthèse de l'ARN dans le noyau (sans nucléole) est plus grande que celle dans le nucléole. Une discussion quantitative des courbes trouvées montre qu'il existe probablement un transport de l'ARN du noyau au cytoplasme.

---

*Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln.
**Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

ANALYSE CYTOCHIMIQUE ET AUTORADIOGRAPHIQUE DU RÔLE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES CELLULAIRES

P.V. MAKAROV

Laboratoire de cytologie à l'Université de Léningrad, URSS
Chaire de biologie générale de Médecine hygiénique
Léningrad, URSS

On a choisi comme objet d'étude les oocytes de grenouille, les cellules des glandes salivaires des larves de Drosophila, les oeufs en état de clivage de Parascaris equorum etc. Les études avaient pour but la détermination du contenu des acides nucléiques (ADN et ARN), des protéines basiques et acides, ainsi que l'incorporation de méthionine S^{35} et de phosphate de sodium P^{32}.

Au cours du développement des noyaux des oocytes, on observe les phénomènes suivants: la synthèse continue des protéines acides, l'absence des protéines basiques dans le nucléoplasme; la présence de l'ADN n'a pu être constatée jusqu'à présent. On voit dans ces noyaux une incorporation intense de méthionine S^{35} et de P^{32}. Dans la période du mois d'octobre jusqu'au mois de janvier, l'incorporation des isotopes examinés dans les oocytes de forme menue et moyenne prend fin, et les oocytes passent à l'état d'interphase. Vers la mi-hiver, la synthèse ininterrompue des protéines acides de noyaux et de nucléoles dans de gros oocytes se ralentit, et c'est à ce moment qu'on commence à observer la présence de nucléohistones liées aux chromosomes. La formation des protéines nucléaires acides pendant la télophase est suivie dans les oeufs en état de clivage chez Parascaris equorum par la perte de l'ADS et de protéines basiques. Au cours de la prophase, on observe à nouveau la synthèse des nucléohistones. Les noyaux en croissance des glandes salivaires des larves de Drosophile s'enrichissent de nucléohistones localisées dans des chromosomes gigantesques. La synthèse des protéines acides s'y passe à une échelle plutôt moyenne, ce qui est confirmé par les données de l'autoradiographie. Tous ces résultats obtenus permettent d'avancer la supposition que la synthèse des protéines nucléaires acides s'effectue aux dépens des nucléohistones, de l'ADN

pour la plupart, et cette dernière à son tour se forme sous l'action des protéines acides du noyau.

Durant la vitellogénèse, on observe dans les oocytes de grenouille la dépense de l'ARN cytoplasmatique. Au cours de l'interphase, quand la synthèse protéique s'arrête, on constate l'augmentation très accentuée du contenu de l'ARN. Par conséquent, l'abondance du cytoplasme de l'ARN ne peut être considérée comme une indication de la synthèse intense des protéines cytoplasmatiques. La vitellogénèse terminée, le nombre de nucléoles dans les gros oocytes augmente plus de 7 fois (de 200 à 1500). Cela peut servir de témoignage que la masse considérable de nucléoles ne confirme point le niveau élevé de protéines déjà formées du cytoplasme.

ULTRAVIOLETTMIKROSPEKTROPHOTOMETRIE

W. SANDRITTER*

Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität
Frankfurt am Main

The cytophotometry with UV-light as introduced by Caspersson in 1936 placed a new sphere of investigational possibilities within reach of photometric methods. The measurements of biological objects with dimensions of a few μ and concentrations and weights in the range of 10^{-12}g became a practical reality. A review of this complex field, in which many of the fundamentals are still being discussed, should be directed toward, 1) revealing possible sources of error 2) the comparison of UV-cytophotometry proven methods of measurement currently in use 3) emphasizing those areas in the medical and biological sciences where the new method may be profitably applied.

The first part, using our own equipment as examples, describes the apparatus for photography with UV-light. A one beam cytophotometer which was built from purchasable elements and a two-beam scanning-cytophotometer with automatic registration are also described. The discussion of theoretical fundamentals gives special attention to the possibilities of errors introduced both by the apparatus and the biological object. Nine basic conditions which are prerequisites for cytophotometric measurements are defined.

The numerical aperture of the objective must be not less than 0·85 to insure inclusion of stray light. Smaller numerical apertures lead to an increase of extinction. The numerical aperture of the condensor must be smaller than that of the objective (½–⅓). The smallest measurable object is approximatly 3 to 4 times larger than the wave length of the incoming light.

The non-homogenous character of absorbing material (in interdependence on the distribution of chromophores and the peak of extinction) leads, by large photomultiplier openings, to a lowering of the measured extinction. This error can be eliminated by using a small photomultiplier opening. The various indexes of refraction within the biological object itself increase the stray light and consequently the non-absorption light loss. Freezing drying of the tissue and matching of the refraction indexes are prerequisites for accurate measurements.

The stray light which appears in monochromator and microscope can be appreciably reduced. Trials on the model-system to test the apparatus must be made.

The interpretation of results requires an exact knowledge of the absorbing substances to be measured in UV-light as well the changes in absorption which occur when they are exposed to other influences (fixation, *pH* changes etc).

The fields of application open to UV-photometry are briefly discussed in the second part. Very satisfying results are obtained with this method in the field of genetics. The nucleic acid content of the individual cell can be measured in absolute units. Since both DNA and RNA absorb UV-light, values for DNA are obtained only after treatment with ribonuclease.

The UV-photometry may shed new light on the significance of RNA for cell division and growth as well as on the function of gland cells, nerve cells and endocrinological organs. Own investigations on the relation between nucleolus and RNA in the adrenal cortex cytoplasmas well as those made on the Langerhans islands of the pancreas may be cited as examples.

The new method will prove especially valuable in the field of tumor pathology. The possibility of cytodiagnosis with photometry should be given special consideration.

Pronounced changes in the nucleic acid-protein metabolism following virus infection have also been observed.

The UV-absorption range of 300—400 mμ, in which the thyroid colloid and certain pigments such as the carotinoids and enzymes of the citrus acid cycle evidence absorption have received relatively little attention. The first investigations of the lipofuscin-pigment, haemosiderin and melanin are presented here.

The areas of apllications for the cytophotometry in biological and medical sciences have by no means been exhausted.

UN MICROSPECTROPHOTOMÈTRE SELON LE PRINCIPE DU "FLYING-SPOT" POUR QUANTIFIER L'ABSORPTION DES RAYONS ULTRAVIOLETS PAR DES CELLULES VIVANTES*

J.J. FREED and J.L. ENGLE

The Institute for Cancer Research, Philadelphia 11, Pa, U.S.A.

Une modification du microscope à "flying-spot" est en train d'être mise au point dans notre laboratoire, dans le but de réaliser l'analyse sériée de la quantité d'acides nucléiques et de protéines dans une même cellule vivante, selon l'absorption des rayons ultraviolets. Le système permet la formation de l'image avec une perte minimum des rayons ultraviolets entre l'objet éclairé et le détecteur photosensible. Le réglage de la mise au point d'ailleurs n'exige pas de radiation excessive; ainsi est assuré un rendement plus efficace, exprimé comme le rapport "signal/bruit" par unité de la dose ultraviolette appliquée à la cellule. Cependant, le tube des rayons cathodiques qui a servi pour l'émission des rayons dans les microscopes à "flying-spot" jusqu'ici ne donnait pas de rayons monochromatiques d'intensité assez forte; l'appareil nouveau dépend donc d'un système mécanique pour la formation du "raster".

Une lampe à arc et un monochromateur fournissent une source très étroite de lumière monochromatique; celle-ci est réduite par des optiques spéciales perméables à l'ultraviolet à un point très petit dans le plan de l'objet. Un miroir, pourvu d'un système de balayage vertical et horizontal, déplace l'image du point et produit un "raster" de 240 lignes, caractérisé par une durée de balayage vertical de deux secondes et par des proportions égales. Un tube photomultiplicateur est placé en contact avec l'objet; son signal est amplifié et est relié au tube de télévision ayant un écran de haute persistance. Le signal est intégré pour la surface désirée à l'interieur du "raster", rendant donc possible le calcul de la quantité de matérial qui absorbe les rayons dans une cellule ou dans une partie localisée de la cellule.

*Aidé par une subvention AT((30-1) 2356 accordée par la United States Atomic Energy Commission.

VERGLEICHENDE UV-PHOTOMETRISCHE NUKLEINSÄUREBESTIMMUNGEN AN NORMALEN UND TUMORZELLEN DES MENSCHEN*

H. HÄHRER und H. KAFFENBERGER**

UV-photometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermien (Mensch, Bulle) und diploiden Zellen (Thymuslymphocyten, Zellen des Bronchialbaumes) zeigen, dass sich der Nukleinsäuregehalt (DNS) dieser Zellen entsprechend der Chromosomenzahl wie 1 : 2 verhält. Die Nukleinsäurebestimmungen an Zellkernen von 6 menschlichen Carcinomen ergeben, dass alle Tumoren einen hohen Prozentsatz (19–83%) an Zellkernen aufweisen mit einem über einer gewissen Grenze liegenden Nukleinsäuregehalt. In normalen Zellpopulationen kommen maximal nur 12% Zellen mit erhöhtem Nukleinsäuregehalt vor. Eine photometrische Cytodiagnostik scheint demnach aussichtsreich.

Eine nähere Analyse der Häufigkeitsgruppierungen der Messwerte einzelner Tumoren lässt erkennen, dass jeder Tumor individuelle Verdoppelungsreihen aufweist, die von den normalen euploiden Chromosomensätzen bzw. DNS-Gehalt abweichen. Der erste Häufigkeitsgipfel "Stem-line" liegt bei den meisten untersuchten Tumorpopulationen zwischen diploiden und tetraploiden Werten, nur zwei Tumoren zeigen eine hypodiploide Stammlinie.

*Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

**Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität Frankfurt am Main (Abteilung Prof. Dr. Sandritter), Gartenstrasse 229, Deutschland.

ULTRAVIOLET FLUORESCENCE MICROSCOPY AS A NEW FIELD OF HISTOCHEMISTRY

M. N. MEISSEL, E. M. BRUMBERG, T. A. GRIGORJEVÁ, I. J. BARSKI and A. W. GUTKINA

Institute of Biophysics,
Academy of Sciences of USSR, Moscow

Fluorescence microscopy in visible spectral region has already occupied a definite place among important histochemical methods. As it is well known it requires in most cases the usage of fluorescent stains for revealing specific substances in cells and tissues.

Fluorescence microscopy in ultraviolet region spectral, which does not need any fluorochromes, allows to detect by photographic means with subsequent colour transformation of the images, the ultraviolet autofluorescence of cells, tissues and other biological objects. The specific nature of this autofluorescence depends on the peculiarities of their chemical composition and physico-chemical state.

The systematic investigations of different tissues and organs showed that many of them possess strongly pronounced and specific ultraviolet autofluorescence.

We have come to conclusion that ultraviolet fluorescence microscopy appears to be of great importance for the histochemical studies of such objects as muscle, collagenes, and some secreting cells.

HISTOPHOTOMÉTRIE (MICROPHOTOMÉTRIE, MICROSPECTROPHOTOMÉTRIE) DANS LE VISIBLE

M. LOCQUIN

Principe. Utilisation des données photométriques d'une image vue au microscope pour étudier qualitativement et quantitativement la répartition histologique ou cytologique de constituants cellulaires colorés naturellement ou artificiellement.

Historique. De la microphotométrie globale, par réduction de la plage sur laquelle porte la mesure, on passe à la microphotométrie ponctuelle, à laquelle le nom de Lison reste rattaché comme étant le 1er réalisateur d'un équipement de ce type. A partir de celle-ci divergent deux séries d'équipements: les "Tomophotomètres" ou microphotomètres à balayage, explorant l'objet par tranches photométriques linéaires juxtaposées et les "équidensitographes" explorant l'objet par tranches d'égales densités superposées.

Parallèlement une autre évolution se dessine qui va de la photométrie en lumière blanche à la spectrophotométrie en passant par la microcolorimétrie, toutes ces méthodes pouvant en principe être associées aux précédentes.

Limites. La limite absolue est la longueur d'onde de la lumière utilisée dont dépend le pouvoir séparateur du microscope. En fait, bien d'autres facteurs limitants apparaissent, soit liés à l'objet: bruit de fond structural, géométrie, diffraction – soit liés à l'optique: ouverture, – soit liés à la chaîne détectrice, amplificatrice et traductrice généralement électronique: bruit de fond instrumental, dérives...

Instruments. Brève description des principaux instruments utilisés pour:

a) la photométrie globale
  - microphotométrie directe
  - densitométrie avec intermédiaire photographique

b) la photométrie ponctuelle
  - simple faisceau
  - double faisceau

c) la tomophotométrie

d) l' equidensitographie photographique

e) l'equidensitographie électronique

f) la microcolorimétrie {trichrome / polychrome}

g) la microspectrophotométrie ponctuelle

h) la tomospectrophotométrie

i) la spectrotomophotométrie

j) la microspectrographie d'étincelle et l'eccetron spectral pour le dépouillement automatique des spectres.

Méthodes. Comparaison des performances des appareils à simple et à double faisceau. Choix des méthodes en fonction de la structure des objets, du niveau de l'analyse par rapport aux facteurs limitants, de la somme d'informations désirées par rapport au temps dont on dispose.

Objets. Recherche sur objets animaux et végétaux des principaux corps:

naturellement colorés,

colorés spécifiquement;

traduction qualitative et quantitative par rapport à la masse tissulaire et cellulaire.

Extension des méthodes:

aux dichroïsmes naturels,

aux dichroïsmes provoqués par coloration,

aux dichroïsmes de phase,

aux fluorescences spécifiques,

aux spectres d'émission.

Classification sommaire par caractéristiques chimiques des corps dont l'étude a été faite ou est possible à l'aide de l'Histophotométrie en lumière visible.

Classification sommaire par caractéristiques physiques (photoniques) des corps dont l'étude est possible à l'aide de la microphotométrie en lumière blanche ou monochromatique

Conclusion. L'histophotométrie dans le visible n'est qu'à l'aube du premier de ses plus beaux jours. Instrument essentiel de l'histologiste et du cytologiste, le microscope, outil jusqu'ici qualitatif au service du morphologique se transforme grâce aux microphotomètres qu'on lui adapte en un instrument de mesure photométrique permettant une extension réelle à l'échelle de la cellule ou du tissu de la plupart des méthodes de la chimie analytique minérale et organique. Une nouvelle branche de la science où convergent l'histologie et la chimie: la "micromorphochimie" est en train de naître sous nos yeux, pleine d'avenir et de promesses tant dans le monde botanique trop souvent parent pauvre dans les réunions qui ont précédé notre Congrès que dans le monde animal et plus particulièrement en histologie humaine.

ANALYSE DE CERTAINS FACTEURS DE VARIABILITÉ DANS LE RELEVÉ DES DONNÉES HISTOMÉTRIQUES

U. BIANCHI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

L'importance que les données morphométriques ont assumé, outre leur signification intrinsèque bien connue, dans les recherches quantitatives histophysiques et histophotométriques en particulier, a conduit l'Auteur à rechercher les conditions les meilleures pour permettre d'obtenir le degré de finesse et de précision nécessaire à la recherche quantitative.

La variabilité des données est examinée par rapport à de multiples causes d'erreur de systématique ou dues au hasard, ainsi que la mesure dans laquelle ces facteurs agissent sur l'acquisition des mesures.

On analyse en particulier la variabilité a) individuelle sur des objets divers et avec des micromètres différents, b) selon la courbure du champ, c) par rapport à de multiples systèmes de relevé des dimensions, d) suivant les conditions d'illumination de la préparation; les données sont vérifiées sur des modèles préparés à cet effet et dont les dimensions sont connues. On suggère de simples précautions permettant de relever plus correctement les données; on fait remarquer qu'il reste toujours une erreur résiduelle qui peut influer davantage sur les mesures de quantité que la variabilité qui dépend de la détermination des concentrations.

On propose en outre de nouvelles idées pour l'utilisation de l'histophotométrie dans le but d'obtenir des données morphologiques, en analysant la forme, la situation, les dimensions de l'objet à examiner, et l'erreur morphométrique probable au cours des relevés: ceci au moyen de la comparaison entre les données quantitatives obtenues, les unes indépendamment de la donnée morphométrique, les autres indépendamment des mesures de concentration et de volume.

QUANTITATIVE STUDY OF THE FEULGEN REACTION WITH DNA CONTAINING CELLULOSE FILMS

P. van DUIJN and J. P. PERSIJN

Biochemical Section Laboratory for Pathology, Leiden, The Netherlands

For quantitative study of cytochemical reactions with the aid of model substances it is desirable to incorporate such substances in a kind of artificial section.

In this way the molecular environment of the compound can be modified and the rapid changing of media, as is customary in many staining reactions, can be imitated.

To study the Feulgen reaction, DNA was mixed with viscose (cellulose xanthogenate) and cellulose films were made from this mixture. On such films the Feulgen reaction, with appropriate controls, was carried out. Extinctions were measured while the membranes were in a stretched position in a spectrofotometer cell, filled with *o*-xylene. In this way the spectrum of the DNA-Schiff complex could be determined.

At the site where the lightbeam of the spectrofotometer had traversed the film, a part of the film of known surface area was punched out.

The punches were dried, weighed and analysed for DNA-P. In this way the extinction measured could be corrected for local variations in thickness of the films and for loss of DNA from the films during the Feulgen procedure.

Results on the relation between the extinction measured and the DNA content after staining will be presented.

THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID CONTENT OF LEUCOCYTES

A. J. HALE* and SYLVIA J. WILSON

Institute of Physiology, The University, Glasgow

Investigations of Feulgen stained leucocytes of peripheral blood, bone marrow and lymph node, using an integrating microdensitometer, have shown that the modal amount of DNA in these cells differs from that of certain other cells of the same species. It has also been found that this difference is not due to different Feulgen-reaction characteristics of leucocytes.

The distribution about this modal value in normal bone marrow and lymph node is characteristic of a normal actively dividing tissue. This is also true for most samples from the peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of cases of leukaemia. In a certain small number of cases of leukaemia there is however a change in the distribution which is characteristic of certain malignant cells.

The relationship between the degree of differentiation and the nucleoprotein content of leucocytes has also been investigated.

---

*Present address: Division of Pathology, Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields, London, W.C.2.

COMMUNICATION N° 2

QUELQUES ASPECTS QUANTITATIFS DE LA SYNTHÈSE DE L'A.D.N. EN RELATION AVEC L'HÉPATECTOMIE EXPÉRIMENTALE

R. LAQUERRIÈRE et R. LAUMONIER

Rouen

Les modifications apportées dans la charge nucléaire en acide désoxyribonucléique (A.D.N.) des cellules hépatiques après hépatectomie sont, depuis quelques années, très étudiées. En particulier, les travaux de Stowell, de Fautrez et ses collaborateurs font autorité. Mais certains aspects particuliers restent à dégager. Les phénomènes peuvent être présentés dans deux conditions: Hépatectomie simple, action du plasma de ces animaux à des sujets témoins.

La *méthode* employée est une analyse sur coupes colorées par la réaction de Feulgen avec l'histophotomètre de L. Lison.

Les animaux d'expérience sont la souris, le cobaye et le rat. En général, chaque tissu normal ou modifié est soumis à 100 mesures minimum mais parfois à 200 ou 400. Dans des conditions identiques de préparation, et sur la même lame, la valeur diploïde théorique est déduite de la mesure de 50 noyaux, de spermatocytes I, du même sujet.

Les *résultats* des deux séries d'études représentent un total d'environ 40 000 mesures.

1) Après hépatectomie de 1/3 environ du poids de l'organe, les sacrifices ont lieu à des dates échelonnées entre 24 h et 9 jours.

La distribution des taux de D.N.A. chez la souris et le rat, aboutissent progressivement à un décalage de la classe 2n, qui s'approche de la classe 4n. Au 9ème jour les classes ont fusionné à 4n, et l'histogramme ne présente plus qu'une seule pyramide 4n.

Chez le cobaye, où n'existe qu'une classe diploïde, la valeur augmente pour se situer entre 2 et 4n. Mais la fragilité de cet animal a réduit le nombre des résultats.

2) Pendant la période d'active synthèse du D.N.A. le plasma (recueilli sur milieu citraté) de chaque animal a été injecté à des animaux normaux. Un grand nombre de témoins a reçu un plasma normal, ou du

citrate, ou le culot hématique de centrifugation. Les injections ont été faites en utilisant un plasma recueilli aux 1er, 2ème, 3ème, 4ème et 8ème jour, après hépatectomie, et les sujets récepteurs étaient sacrifiés soit au 1er, soit au 4ème jour après injection.

Lorsque le plasma est prélevé au bout de 24 h, peu de modifications apparaissent. Par contre, au 4ème jour, le plasma induit une synthèse constante, et intense du D.N.A., atteignant 80 à 100%, réalisant même des taux octoploïdes.

La propriété de ce plasma diminue puis disparaît au 8ème jour. Tous les animaux témoins (36) ne présentent aucune modification de l'histogramme hépatique.

Ce fait suggère donc la présence dans le plasma d'un animal hépatectomisé, d'un facteur de stimulation des synthèses de l'A.D.N. Ce facteur n'a jamais été retrouvé chez les sujets normaux témoins.

RAPPORT SUR L'UTILISATION DE LA SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE EN HISTOCHIMIE ET EN CYTOCHIMIE

J. LECOMTE

Membre de l'Institut
Directeur de Recherches au Centre National
de la Recherche Scientifique

HISTOSPECTROGRAPHIE DE FLUORESCENCE: RELATIONS FONCTIONNELLES ET BIOCHIMIQUES

De LERMA

Bari

La microspectrographie ou histospectrographie de fluorescence consiste dans l'analyse au microscope du spectre de la lumière de fluorescence émise, sous l'excitation ultraviolette, d'une partie bien délimitée d'une coupe. Le but d'un tel type de recherche biophysique est d'atteindre à l'identification de la nature chimique des substances fluorescentes dans le tissu par comparaison du spectre enregistré au microscope avec le spectre de composés déjà connus. Dans ce sens cette méthode acquiert la valeur d'une signification histochimique méthodique et précise.

Le problème de l'identification des composés fluorescents sur coupes devient, en effet, un problème de spectrochimie et sa solution nécessite, avant tout, l'évaluation exacte et objective du spectre de la lumière de fluorescence émise d'une certaine partie des coupes. À l'exception de quelques substances biochimiques, telles que les porphyrines, les chlorophylles, dont le spectre de fluorescence est bien caractérisé par quelques bandes minces dans l'orange et le rouge, le plus souvent les substances fluorescentes contenues dans les tissus donnent des spectres qui consistent dans une large bande continue, dépourvue de structure et sans maxima caractéristiques. C'est pour cela que l'analyse spectrophotométrique de la lumière de fluorescence enregistrée au microscope devient nécessaire. Et c'est pourquoi la méthode en question est désignée plus exactement comme "histospectrophotométrie de fluorescence".

L'appareillage dont s'est servi l'Auteur consiste essentiellement en un spectrographe à forte luminosité relié à un microscope de fluorescence de telle façon que la délimitation de la structure fluorescente observée dans la coupe – et dont le spectre est à enregistrer – soit absolument précise.

Après avoir traité explicitement des relations qui existent entre les fonctions chimiques et le spectre de fluorescence, l'Auteur examine quelques questions de strict intérêt histochimique, questions qui ont trait à l'identification de la sérotonine (5-hydroxytryptamine), de l'adrénaline et nor-adrenaline, de la Vitamine A et des hormones stéroliques. L'Auteur touche aussi la question de la fluorescence des chromolipoides dans ses relations aves le degré d'autoxydation de corps gras.

Enfin il souligne l'intérêt que l'emploi de quelques fluorochromes présente pour l'histochimie, tel que l'acridine orange, la phosphine 3R, la rhodamine B, le rouge de Magdala, etc., aussi bien que le 3,4-benzopyrène qui, en tant que hydrocarbure polycyclique cancérigène, peut donner lieu à des interactions avec l'acide désoxyribonucléique dans les noyaux de cellules vivantes.

IMMUNOHISTOCHIMIE

H. MAYERSBACH

Graz – Lausanne

Les méthodes "d'immunohistochimie", développées par Coons, qui consistent dans l'emploi d'un anticorps marqué pour repérer le matériel antigénique des cellules et des tissus ont pris une importance de plus en plus grande en histochimie. A l'aide de ces réactions immunologiques, il est possible de montrer dans les cellules plusieurs substances (protéines, polysaccharides, etc.,) qui ne peuvent être mises en évidence de manière spécifique par d'autres techniques histochimiques.

Le principe des réactions immunohistologiques est extrêmement simple: une préparation histologique est d'abord recouverte par une solution contenant un anticorps marqué à la fluorescéine; les cellules qui renferment l'antigène spécifique précipitent l'anticorps marqué. Après lavage des protéines qui ne sont plus liées, la présence de l'antigène dans les cellules est prouvée par l'anticorps fluorescent qui est solidement attaché à lui.

Malgré la simplicité du principe, plusieurs questions techniques importantes se posent en connexion avec la préparation des réactifs et la confection des coupes.

Cette communication traite exclusivement des possibilités et des questions techniques fondamentales: la spécificité des immuns sérums, le choix des substances de marquage et des procédés pour couper et fixer les tissus. Le facteur très important de l'absorption non spécifique du sérum à la surface des coupes (très rarement mentionné, bien qu'il soit une source d'erreurs) est discuté en rapport avec les recherches de l'auteur portant sur ce domaine particulier.

THE USE OF A FLUORESCEIN-CONJUGATED BASIC POLYSACCHARIDE (APS) TO DEMONSTRATE ACIDIC POLYSACCHARIDES IN TISSUE*

E. E. EVANS and S. P. KENT

Departments of Microbiology and Pathology,
University of Alabama Medical Center,
Birmingham 3, Alabama, U.S.A.

THE COMBINED FLUORESCENCE–PHASECONTRAST MICROSCOPY AS A METHOD OF INVESTIGATION IN THE PROCESS OF PHAGOCYTOSIS

D. WITTEKIND

Medizin. Univ. Klinik, Heidelberg

The close combination of phase-contrast with fluorescence-microscopy has proved valuable in experiments on living cells. Phasecontrast-microscopy, demonstrating only the optical qualities of an object, will be usefully completed by fluorochroming structures, e.g. by using a staining method. After a short explanation of constructive features of the combined microscope its qualification for recognising cell viability will be demonstrated with phagocytes as an example. The question is discussed of how ingested material may influence the way in which phagocyting cells are shown in fluorescence-and phase-contrast microscopy. The possibility is stressed of suspending living cells in concentrated isotonic protein solutions (f. i. albumin and globulin). When the protein content is sufficiently high, the cell will appear in negative phase-contrast. For keeping the cell interior in negative phase-contrast the cell membrane must necessarily remain impermeable for substances of high molecular weight. Thus an additional and valuable hint on cell viability is given: Conservation of negative phase-contrast being no reliable criterion of a living cell, a change to positive phase-contrast is not consistent with cell viability. The appearance of living cells is compared with that after fixation and use of staining methods, as a contribution to the question of how certain intravitally observed structures are resistent to histochemical procedures.

UN NOUVEAU CYTODIAGNOSTIC DU CANCER PAR MICROSCOPIE FLUORESCENTE

L. von BERTALANFFY

Une méthode fluorescence-microscopique employant le fluorochrome, Orange d'Acridine, était introduite récemment à distinguer les acides désoxyribonucléiques, les acides ribonucléiques et d'autres composants de la cellule. À cause de sa métachromasie, l'Orange d'Acridine, appliqué par une technique adéquate, montre l'ADN, à fluorescente verte, et l'ARN, en raison de sa concentration, par des nuances brunes, rouges ou orangées brillantes. Par son application aux tissus normaux, des corrélations entre la teneur en ARN, la synthèse des protéines, l'activité mitotique, etc., peuvent être établies. Le méthode à l'Orange d'Acridine est un nouveau moyen cytochimique pour le diagnostic du cancer en cytologie exfoliative. À cause de leur teneur excessive en ARN, les cellules malignes viables présentent une fluorescence rouge ou orangée intense et peuvent être décelées facilement. Le diagnostic définitif est basé sur des critères cytochimiques et morphologiques. Cette méthode présente des avantages importants, tels que la rapidité et la simplicité de la technique, la facilité de reconnaître les cellules malignes, la réduction du nombre de questions posées aux techniciens, etc. La certitude diagnostique de la méthode est grande, et égale celle des autres procédés cytodiagnostiques qui exigent, elles, des investigations étendues. La méthode nouvelle est particulièrement de valeur pour la détection du cancer gynécologique et pulmonaire, mais elle est aussi valable dans le cadre général de la cytologie exfoliative.

APPLICATION D'HISTOPHOTOMÈTRE UNIVERSEL POUR ÉTABLIR LES COURBES DE FLUORESCENCE ET D'ABSORPTION

L. ZANOTTI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

L'Auteur a construit un histophotomètre particulier, conçu selon le principe des modèles Vialli. Un viseur "Reflex" relie, pour centrer l'image, le microscope à la fente d'entrée d'un monochromateur à réticule de Bausch et Lomb. Un photomultiplicateur, appliqué à la fente de sortie du monochromateur mesure l'intensité des différentes radiations. Quand on connaît sa courbe de réponse on remonte à la courbe de fluorescence. On peut utiliser ce dispositif, tant avec la lumière transmise qu'avec la lumière réfléchie et la radiation excitatrice s'obtient à l'aide d'un dispositif "fluorex" Reichert. Si l'on veut utiliser d'autres lumières excitatrices, on peut illuminer le dispositif "fluorex" avec un second monochromateur, obtenant la concentration à l'aide d'une optique de quartz.

L'appareil permet d'obtenir rapidement des courbes de fluorescence pouvant être reproduites parfaitement et met aussi en évidence la signification de légères variations de couleur de la fluorescence même. A l'aide de cet instrument, on peut également obtenir des courbes d'absorption, soit dans le visible, soit avec une optique adaptée, dans l'ultraviolet.

Comme exemple de courbes de fluorescence, nous avons étudié celles des glandes à venin de différents amphibiens. En particulier, l'examen de "Discoglossus pictus", dont le venin est très riche en 5-hydroxytryptamine, a démontré la possibilité d'étudier des cadres très variés, en examinant même des granulations isolées.

POLARIZED MICROSCOPY IN HISTOCHEMICAL RESEARCH

H. H. PFEIFFER

Polarized optics, especially if applicated quantitatively, assist a microscopist to notable contributions to our knowledge of leptonic structure of biological and medical objects under physiological and pathological conditions. But beyond this main task, researches in polarization microscopy employed to fresh or fixed and sectioned tissues have also an important profit for securing and relief of identification of chemical compounds. Observations and measurements in polarized light are chiefly situated in the following directions.

1) It occurs very rarely that definite substances may be recognized only on the behaviour against polarized light, as optical negative nucleic acids in contradistinction to the positive character of proteins;

2) At some anisotropic structures there are to produce topochemical reactions which are accompanied with a change of the optical character, e.g. after treatment with mono-valent phenoles, sumach-extract or glycerol.

3) By Lison it has been shown that lipoids if examined with polarized light can be allotted into several histochemical groups by means of a thermical claim so the further analysis simplifying.

4) The identification of crystalline precipitations comprehends trials with the polarization microscope to study the occurrence of anisotropy, its intensity and character, and the decision if dichroism (double absorption) appears.

5) Dichroism in ultraviolet light is found without staining in nucleic acids, whose purine and pyrimidine components may be arranged in parallel planes to each other and the electric vector of the polarized light.

6) Organic dyes such as Congo red or thionin may, in some cases, be attached to tissue components in such a way that the dye molecules are themselves oriented sufficiently to endow to structure with dichroic properties.

In the face of all these facts we have to admit that the polarization microscope ought to be used also in histochemistry. In some communications we shall become acquainted with more experiences in that respect.

SPEZIELLE POLARISATIONSOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EXPERIMENTELL VERANDERTEN BINDEGEWEBSFASERN

LINDNER

Hamburg

Nachdem wir als primäre Folge chemischer und mechanischer Schädigungen von Bindegewebsfasern eine Störung der Faser-Kittsubstanzbeziehungen gefunden haben, wurden systematische polarisationsmikroskopische Untersuchungen an isolierten Fasern der Rattenschwanzvene vorgenommen. Wir prüften den Einfluss folgender Stoffe auf das polarisationsoptische Verhalten (und zugleich auf die Quellung, Gewichts-dicken und Volumenzunahme) der Kollagenfaser: 1. Niedermolekulare organische und anorganische Säuren und Vergleichslösungen, 2. Mucopolysaccharidsäuren und Makromolekulare Vergleichslösungen und 3. verschiedene Pharmaka, speziell Hormone und Antiphlogistica. Um die Stoff-oder Stoffgruppen-abhängigen Wirkungen auf die Faserstrukturen, bzw. auf die Beziehungen der Protein- und Polysaccharidanteile der Kollagenfaser möglichst fortlaufend beobachten zu können, wurden nicht nur inkubierte Fasern in verschiedenen Zeitabständen untersucht, sondern vor allem Quellungs- und Entquellungsversuche unter direkter polarisationsoptischer Betrachtung vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im einzelnen vorgewiesen. Sie sind in drei Punkten zusammenzufassen: 1. Die Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf die isolierte Kollagenfaser ist im Prinzip nicht gleichartig, sondern unterschiedlich, in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der eindringenden Flüssigkeit und deren Reaktionen mit den Faserbausteinen (und ihrem Gefüge). 2. Da ein Teil der Testsubstanzen körpereigene oder therapeutisch verwendete Stoffe sind, ergeben diese Untersuchungen wichtige Einblicke in die Reaktionsmöglichkeiten von Kollagenfasern *in vivo* - im Bereich von Freisetzungen oder Anreicherungen der betreffenden Substanzen im Bindegewebe. 3. Die detaillierten Befunde sind in der Lage, weitere Einzelheiten der komplizierten Struktur von Kollagenfasern aufzuklären. Die Kollagenfaser stellt eine kontinuierliche Serie schraubiger

Aggregate ihrer Untereinheiten dar, zwischen denen Kittsubstanzen liegen. Dieser ausserordentlich innige Zusammenhang zwischen den Polypeptid- und Mucopolysaccharidanteilen ist die Grundlage für die Struktur und Funktion der Kollagenfaser. Das gilt im Prinzip auch für die Retikulin- und Elastinfaser.

TOPOCHEMICAL REACTIONS IN POLARIZATION MICROSCOPY OF CONNECTIVE TISSUE AND ITS INTERCELLULAR SUBSTANCES

G. ROMHÁNYI

(Pécs)

Topochemical reactions (TR) provide a useful approach to the study of the submicroscopic and chemical organisation of collagen, elastic and reticulin fibres, and connective tissue ground substance.

In an optical sense by TR are ment events in which uncoloured or coloured compounds are associated in an orientated pattern on anisotropic substrates enhancing or reversing their original birefringence.

The type and strength of binding of the associating components in TR may vary from true chemical bonds to loose reversible adsorption. The optical effect of anisotropic staining — often associated with anomalous colours — can be markedly enhanced and stabilized by appropriate precipitating agents used after staining and also in the mounting medium.

It was possible to show that by different TR (phenol-anilin reaction and anisotropic toluidinblue staining) the elastic fibres of the aorta have a fibrillary structure with a spiral arrangement of their submicroscopic filaments, the degree of elevation of the helicoid being 45° in the elastic fibres of young humans and about 20 to 25 degrees in the elastic fibres of ox ligamentum nuchae.

It was found that apart from their well known and characteristic phenol reaction (Ebner) collagen fibres showed anisotropic staining with the acridine dye rivanol becoming negatively birefringent, which seems to be a characteristic TR of the collagen fibres.

Recently considerable attention has been paid to the structural and functional significance of the AMP contained in the ground substance the structural organization of which has not yet ben clarified unambiguously. However, the fact that after anisotropic staining with appropriate basic dyes below *pH* 4·0 collagen fibres, and also collagen fibrils precipitated *in vitro* with CHSA, become negatively birefringent can be related to the AMP component contained in the fibres in an organized pattern. Furthermore, polarization optical findings suggest that metachromasia seen in

the collagen fibres is also due to an orientated alignement of the dye molecules, on the orientated AMP components in the fibre. Thus quantitative data on metachromasia can be obtained from polarization microscopy. Different chemical changes induced in the reactive side groups of the substrates influenced in a specific manner the topochemical reactivity of the collagen and elastic fibres as well as their enzymatic susceptibility to the enzyme elastase.

DIE BEEINFLUSSUNG DES POLARISIERTEN LICHTES DURCH DIE AMYLOIDSUBSTANZ

H. P. MISSMAHL

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Direktor: Prof. Dr. H. Bennhold

An Hand der Literatur und eigener Untersuchungen wird der Einfluss von gefärbtem und ungefärbtem Amyloid auf linear polarisiertes Licht dargestellt. Im einzelnen werden dabei folgende Punkte besprochen.

1) Die Doppelbrechung des ungefärbten Amyloid, insbesondere bei beginnender Amyloidose.

2) Die Entstehung anomaler Polarisationsfarben an gefärbtem Amyloid, deren Bedeutung für den Nachweis kleinster Amyloidherde und für die Klärung der Feinstruktur des Amyloid.

3) Das Auftreten von Dichroismus an der gefärbten Amyloidsubstanz.

4) Das Verhalten von metachromatisch gefärbtem Amyloid gegenüber polarisiertem Licht.

Aus Punkt vier ergibt sich der Beweis, dass alle von uns untersuchten metachromatischen Farbstoffe sowohl doppelbrechend, als auch dichroitisch sind. Die Metachromasie wird hierbei lediglich durch die gerichtete Einlagerung der entsprechenden Farbstoffe und die sich hieraus bedingte Summation der optischen Wirkung dieser Farbstoffe hervorgerufen.

RECHERCHES SUR LA MICROSCOPIE DE POLARISATION DES ACIDES NUCLÉIQUES. ACIDES NUCLÉIQUES DES TUMEURS

J. SUGÁR

Budapest

La molécule de l'acide nucléique porte une structure d'une double spirale (Watson et Crick). On peut bien étudier histologiquement cette structure micellaire à l'aide d'un microscope polarisant et qui montre à sa longueur une biréfringence négative (Schmidt). Pour fortifier l'anisotropie, M. Romhányi et M. Jobst utilisent un colorant dichroïque, nommé Rivanol. Depuis quelque temps cette substance est employée en renforcement de la biréfringence, non seulement des acides désoxyribonucléiques (DNA), mais celle des acides ribonucléiques (RNA).

Au cours de nos investigations nous avons étudié par cette méthode la transformation du système des acides nucléiques dans les cellules de la tumeur d'ascite d'Ehrlich et dans une forme d'ascite de la leucémie lymphoïde, d'une part au cours d'une autolyse des cellules, d'autre part sous l'effet produit par les substances cytotoxiques: mannite, moutarde azotée, 6-mercaptopurine, etc. On pouvait constater que la biréfringence des acides nucléiques montrait un abaissement considérable au moment de l'effet maximal dans la plupart des cellules. Un phénomène pareil se présente chez le sarcome de Crocker, explanté et traité *in vitro*. On pouvait observer ce phénomène quand ni la réaction de Feulgen, ni la coloration à la gallocyanine ne démontrait aucune différence d'intensité.

Au cours d'une autolyse les substances se libèrent des acides nucléiques, étant examinées par une technique appliquée de chromatographie; on a constaté que la libération des nucléotides et des nucléosides se produit déjà aprés une durée de 3 heures et on arrive à un résultat considérable pendant 7 à 8 heures. Cette conclusion correspond à une diminution significative de la biréfringence des acides nucléiques.

DIE HISTOCHEMIE DER RETIKULÄREN FASERN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER POLARISATIONSOPTISCHEN UNTERSUCHUNGEN

J. SUGÁR

Onkopathologisches Forschungsinstitut, Budapest

Das Retikulin der Basalmembranen weist für gewöhnlich eine positive Formdoppelbrechung auf. Missmahl's Untersuchungen nach wird die longitudinale fibrilläre Struktur von quergerichteten Lipid molekülketten zusammengehalten, auf die auch die Erscheinung zurückzuführen ist, dass sich die positive Doppelbrechung der Fasern auf Glyzerininhibition zu einer negativen umwandelt.

Unsere Untersuchungen an der Membrana basalis der Niere galten gleichfalls einer Analyse der Eigenschaften dieser interfibrillären Struktur, wobei wir vor allem prüften, welche Veränderungen die Fixierung auslöst, und wie die nachfolgende Behandlung mit Fettlösungsmitteln die oben beschriebene Änderung der Doppelbrechung des Retikulins beeinflusst. Verbringt man nach vorangegangener Formalin-Fixierung die Gefrierschnitte in Fettlösungsmitteln, dann zeigt die Membrana basalis eine positive Doppelbrechung. Grundlegend ändert sich indessen die Lage, wenn man die Nieren in Alkohol fixiert und sodann in Paraffin montiert. Trotzdem nämlich der Stoff in Fettlösungsmitteln gelegen hat, lässt er – mit Glyzerin bedeckt – eine ähnliche negative Doppelbrechung erkennen, wie sie bei den nicht in Fettlösungsmitteln behandelten, gefrierschnitten zu beobachten ist.

Auf biochemischem Wege gelang es, im Retikulin Lipide nachzuweisen, durch histochemische Färbung hingegen lässt sich hier Lipide nicht feststellen. Allein nach der Bouin-Fixierung ergibt sich eine positive Fettverfärbung.

All dies lässt die Feststellung begründet erscheinen, dass in den interfibrillären Strukturen neben den Lipiden auch andere quergeschichtete Ketten vorhanden sein dürften (Brewer). Das Verhalten der Doppelbrechung der Strukturfasern und der Verlauf der histochemischen Reaktion wird weitgehend auch von der Art der Fixierung beeinflusst.

FEHLERBERECHNUNGEN FÜR TROCKENGEWICHTSBESTIMMUNGEN MIT DEM BAKER'SCHEN INTERFERENZMIKROSKOP*

H. G. SCHIEMER

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut
der Universität Frankfurt a. M.,

Es werden die einzelnen Fehlerfaktoren, die bei der interferenzmikroskopischen Bestimmung des Trockengewichtes biologischer Objekte auftreten, diskutiert.

Bei den entsprechenden Überlegungen bezieht sich der Verfasser auf die Trockengewichtsgleichung:

$$M_{\text{Tr. Kern}} = \frac{2}{3} k \left[\frac{\varphi^\circ \cdot \lambda \cdot F}{180^\circ \cdot \chi} + (n_m - n_w) \frac{d \cdot F}{\chi} \right] \quad [g]$$

für sphärische Objekte.

Mit Hilfe der Gauss'schen Fehlerfortpflanzungstheorie wird der prozentuale maximale Fehler im Endergebnis bestimmt. Dieser liegt für φ°(phi) von 10° bis 90° und F (Fläche) von 60 bis 500 μ^2 zwischen ca. 15 bis 20%.

THE USE OF THE ELECTRON MICROSCOPE AS A TOOL FOR THE INVESTIGATIONS OF PROBLEMS IN CYTOCHEMISTRY*

R. J. BARRNETT and L. W. TICE**

From the Department of Anatomy
Yale University School of Medicine
New Haven 11, Connecticut, U.S.A.

Although each of the fields of histochemistry, cytochemistry and electron microscopy have their individual requirements, compromises can be made so that these fields may be combined and information obtained relating fine structure with biochemical function.

When cytochemistry is combined with electron microscopy, it requires either the isolation and purification of an enzyme or enzyme system or the isolation by centrifugation of a morphologically homogenous population of a distinguishable particle that contain an enzyme system to be investigated. However, in each of these cases the isolated material must be identified with electron microscopy and related to similar structures occurring in the intact cells from which the isolated material was obtained. In addition, the pellets obtained by homogenization and centrifugation may be treated as tissues and stained with histochemical techniques and further prepared and examined with electron microscopy. These results may be compared with those of biochemical analysis of the enzyme content of the pellets obtained, and with electron microscopy of histochemically treated intact blocks of the same tissue.

When enzyme histochemistry is combined with electron microscopy, a variety of methodological approaches may be utilized in which the reaction produces either metallic or non-metallic final products. A variety of preparative procedures may be used successfully prior to the histochemical tests, the simplest of which utilizes fresh tissue for *in vivo* or *in vitro* experiments. The histochemical incubations must be carried out in a manner to assure cytological localization of the final product and therefore may be classified as cytochemical. This can be largely accomplished by protection of tissue fine structure from damage and by assuring that the rate of production of the products of enzymatic activity from the substrate does not exceed the local concentration of the reagent at the enzymatic site.

However, fixation in osmium tetroxide after completion of the histochemical incubations is required to relate the site of the final product of the reaction to fine structure as the latter is now accepted. The results of several experiments combining these techniques and concerned with the relationship of oxidative or hydrolytic enzyme activity with fine structure will be presented.

CYTOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF FROG ERYTHROCYTES*

M. A. LESSLER**

Department of Physiology
The Ohio State University, Columbus, Ohio

Although many different variations in technique for the demonstration of dehydrogenase activity by tetrazoliums were used, no staining of frog erythrocytes was observed. The white cells, however, did show some stained granules. Neutral red granules were observed in red cells, but no mitochondrial-like elements could be demonstrated with the Janus Green B technique. Thin-sectioned electron microscope preparations showed the presence of erythrocyte mitochondria. Histochemical techniques were positive for deoxyribose nucleic acid and protein, but ribonucleic acid, mucopolysaccharides, and glycogen were not demonstrable with the techniques used.

CHEMICAL MORPHOLOGY OF THE CONTRACTILE SYSTEM IN SPERMATOZOA

L. NELSON

Department of Physiology, Emory University, Atlanta 22, Georgia

La morphologie du spermatozoïde des mammifères, établie par microscopie électronique de matériel traité par l'acide osmique, a été confirmée par des clichés électro-micrographiques du sperme de l'épididyme du rat "frozen-dried" et fixé par une solution alcoolique d'acétate de zinc et coloré au $PtBr_4$. Les spécimens "frozen-dried" peuvent soit être glycérolés et colorés, soit disséqués chimiquement à l'aide de solutions extractives des protéines musculaires (Weber-Edsall ou Hasselbach-Schneider, KI ou pyrophosphate tamponné) avant de colorer au $PtBr_4$. Ainsi il est possible de déterminer quelles composantes de structure subissent cette solubilisation spécifique. Les spécimens extraits par les moyens indiqués ont été contrôlés cytochimiquement quant à leur réactivité résiduelle enzymatique, et leur réactivité avec des anticorps. Les différences caractéristiques entre l'ondulation du spermatozoïde et la contraction musculaire peuvent apparemment être attribuées à la différentiation morphologique ainsi qu'à l'organisation biochimique. Par exemple, dans le spermatozoïde intact, l'ATP-ase et la pyrophosphatase inorganique (ainsi que les enzymes respiratoires) semblent être concentrées dans les neuf filaments extérieurs longitudinaux de la queue. Les procédés d'extraction permettent de distinguer les entités enzymatiques; la pyrophosphatase inorganique est extraite par le glycérol, mais les filaments conservent leur réactivité à l'ATP-ase et aux autres substances.

DIFFÉRENCIATION SÉLECTIVE DES ACIDES NUCLÉIQUES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

M. L. WATSON and W. ALDRIDGE

University of Rochester, Departments of Pathology and Anatomy,
School of Medicine and Dentistry, Rochester 20, N. Y.

L'un de nous (W. A.) a observé que l'indium trivalent en solution aqueuse acide semble réagir exclusivement avec les acides nucléiques dans le rapport d'un atome d'indium pour six atomes de phosphore nucléique (ce travail fera le sujet d'une publication détaillées ailleurs). La présente communication décrit l'application de cette technique à des coupes de tissus examinées au microscope électronique. Une discussion de la méthode est presentée, accompagnée de micrographies de divers tissus illustrant les résultats qu'il est possible d'obtenir par cette méthode.

USE OF CERTAIN PROTEIN REAGENTS IN THE VAPOUR STATE FOR THE STAINING OF REACTIVE GROUPS IN FROZEN-DRIED SPECIMENS FOR ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES

I. GERSH

Department of Anatomy, The University of Chicago,
Chicago 37, Illinois, USA

Thin specimens (0·1—0·2 mm) of starved mouse liver were frozen by immersion in propane chilled to −185℃ with liquid nitrogen. They were then dried in a vacuum chamber at a temperature of −40℃ or lower. Without breaking the vacuum the dried specimens were post-fixed and stained with anhydrous vapors of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB), and 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (FFDNB). The former is fluid at room temperature and pressure, the latter solid. Both reagents react primarily with free amino groups, and probably others, of proteins, polypeptides, and amino acids. The first reagent reacts with such groups singly, while the second reagent forms bridges between neighboring reactive groups of proteins. As both reagents have a high molecular weight (186 or more) they cause enhanced contrast in all adequate sites where they combine. The structure of the protoplasm is essentially the same as that of unstained frozen-dried material or of frozen-dried material treated with metallic stains. Material post-fixed and stained with FDNB tends to swell during embedding, while material treated with FFDNB shows little or no swelling with the same treatment. Swelling is entirely prevented by double embedding in celloidin and methacrylate. Treatment of frozen-dried specimens *in vacuo* with anhydrous formaldehyde gas prior to treatment with either reagent reduces the colour and reactivity, and the density in the electron microscope. The implications of these findings for an understanding of the term "stabilization" as used in electron microscopy will be discussed.

BIOCHEMICAL STUDIES AT THE ELECTRON MICROSCOPE LEVEL ON STRUCTURALLY INTACT FREEZE-DRIED SUBCELLULAR ORGANELLES

B. W. GRUNBAUM

Cancer Research Institute,
University of California Medical Center,
San Francisco

Pancreas, liver, heart muscle and mammary tissues were freeze-dried in a specially constructed apparatus which permitted preservation of tissue structure for biochemical and cytological studies at the electron microscope level without the use of chemical fixatives and stains. The design of the apparatus incorporates a number of features which facilitate its operation and produce good results: (1) the tissue is embedded in methacrylate or paraffin within the drying chamber without breaking the vacuum; (2) vacuum of 10^{-5} to 10^{-6} mm Hg pressure is easily obtained within 15 minutes because the vacuum system, except the drying chamber, is pre-evacuated; (3) the temperature of the tissue after quenching below -160°C does not rise above -70°C until dry; (4) once the specimen is placed in an open gelatin capsule, which acts as a mould for the embedding material, the tissue is not handled until it is ready for sectioning. Sections cut at 1/20 of a micron revealed high contrast of subcellular detail when viewed with the electron microscope. It was possible to identify fat and protein particles ranging in size from 500 to 8000 mμ and 40 to 300 mμ respectively in the lactating mammary gland. Biochemical studies were carried out directly on the electron microscope grids carrying the specimen. Morphologically the freeze-dried tissues differed from those fixed in osmium-tetroxide. Slides will be shown of the freeze-drying apparatus and various tissue sections as seen with the light and electron microscopes. The technique of biochemical analysis of mammary tissue and its general application will be discussed.

MODIFICATIONS PRÉCISES DE STRUCTURE DES ORGANES DES COBAYES SÉNESCENTS

R. QUINTON COX

Département d'Anatomie, Université d'Emory,
Atlanta, Ga., É-U

Compte-rendu de la découverte, à l'échelon ultramicroscopique de modifications des organes de cobayes sénescents en comparaison de celles de cobayes jeunes et adultes, spécialement en ce qui concerne les modifications observées dans la structure de foie, du pancréas, du rein, des surrénales, du cervelet et de la surface extérieure du cortex moteur.

On présentera aussi des résultats de recherches entreprises actuellement pour démontrer ces tissus dans l'activité histochimique à l'échelon ultramicroscopique.

DES CHANGES DE L'ULTRASTRUCTURE AUX ORGANES DU COBAYE AVEC UNE DÉFICIENCE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

M. SHERIDAN

Département d'Anatomie, Université d'Emory,
Atlanta, Georgie, États-Unis

Les cobayes que reçurent une diète exempte d'acide ascorbique montrent des modifications de l'ultrastructure cellulaire.

Ces changements se produisent surtout dans l'ergastoplasme et dans le chondriome.

Les animaux scorbutiques plus avancés présentent, dans l'ultrastructure cellulaire, des modifications plus manifestes que ceux qui sont atteints d'une réaction scorbutique moindre.

D'après les données obtenues,par cette recherche on a constaté que les changements observés chez les scorbutiques sont qualitativement analogues à ceux qui se produisent à l'inanition, mais que quantitativement ils ne sont pas les mêmes.

CORRELATION OF HISTOCHEMISTRY AND FINE STRUCTURE OF THE IN VITRO SPHERULE OF COCCIDIOIDES IMMITIS

A. M. BRESLAU and J. O. ERICKSON

Veterans Administration Center and U.C.L.A. Medical Center,
Los Angeles, California

The wall and septa of the spherule which are not degraded by diastase, hyaluronidase or lysozyme, stain positively with PAS and negatively with alcian blue. Lamellae of electron transparent fibrils (polysaccharide) are embedded in a matrix which is removed by trypsin.

Corresponding to the lack of the external phospholipid layer in the *in vitro* spherule, the thick electron-opaque layer seen on the *in vivo* spherule is lacking.

The mitochondria which contain phospholipid are arranged around the periphery of the immature spherule. The cristae frequently are longitudinal. The mitochondria reproduce by elongation and fission.

The large number of opaque granules attached to the fine cytoplasmic reticulum correspond to cytoplasmic RNA. The nucleolus is a large dense mass of aggregated crystal-like granules. The nuclear DNA is less clearly visualized, whereas the phospholipid-containing nuclear membrane is clearly delimited.

In the immature spherule, the central vacuole which is largely electron transparent and contains neutral and acid mucopolysaccharide develops in close association with what may be the Golgi Apparatus.

Both the wall and the soluble polysaccharides are antigenic and fix complement.

PROBLÈMES BIOCHIMIQUES

L'HISTOCHIMIE DES NUCLÉOPROTEINES: LE RÔLE DU NOYAU CELLULAIRE DANS LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PROTÉINES

J. BRACHET

Laboratoire de Morphologie animale
Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles

Three different methods are now available for the study of the biochemical role of the cell nucleus:

1) cytochemical methods for the detection of the nucleic acids (DNA, RNA) and the associated proteins, as well as autoradiography techniques which can follow the incorporation of various radioactive precursors into the various cell organelles;

2) comparison of nucleate and anucleate fragments of unicellular organisms, with quantitative ultra-micromethods;

3) homogenization of tissues, followed by differential centrifugation in order to separate the various cell constituents. The advantages and disadvantages of these three main techniques are critically discussed.

The main results obtained with these three methods are presented; the conclusions reached are very similar, if not identical. Here are these conclusions:

1) the main role of the cell nucleus is the synthesis of nucleic acids (both DNA and RNA);

2) in all the cases so far studied, the cell nucleus has been found to exert a much closer control on cytoplasmic RNA synthesis than on cytoplasmic protein synthesis; it is likely that the control of the nucleus on cytoplasmic protein synthesis is an indirect one, mediated through the transfer to the cytoplasm of RNA of nuclear origin;

3) specific proteins can be synthesized in the cytoplasm in the absence of the nucleus, thus in the absence of direct genetic information.

The fact that entirely different methods, applied to a wide variety of biological objects, lead to almost identical conclusion increases confidence in the now available histochemical techniques for nucleic acid protein detection.

HISTOCHIMIE DES PROTÉINES

LUCION LISON

A. *La fixation des protéines*

Son étude est, dans l'opinion de l'auteur un des points fondamentaux de l'histochimie des protéines. Deux points de vue méritent une discussion approfondie.

1. *La fixation comme condition préalable de l'étude topochimique des protéines.* L'étude du mécanisme de la fixation démontre qu'il n'y a pas et qu'il ne peut y avoir de procédé de fixation "indifférent". Un fixateur ne peut pas ne pas modifier les protéines. Le but ā atteindre est non pas une fixation sans modifications mais une fixation avec des modifications connues. Celles-ci peuvent être: a) des altérations des réactions des groupes actifs (disparition par inactivation ou bloquage réversible ou non, apparition par "démasquage" b) des altérations du caractère électropolaire et d'autres propriétés physico-chimiques c) des altérations dans la position relative des chaînes.

2. *La fixation comme moyen d'investigation directe des protéines.* Les fixateurs étant de véritables réactifs, ils fournissent des informations sur la nature des protéines suivant la façon dont celles-ci réagissent avec différents fixateurs.

B. *Les réactions histochimiques applicables aux investigations sur les protéines*

Le squelette caractéristique des chaînes protéiques avec la séquence -NH-CHR-CO- indéfiniment répétée n'est pas accessible ā la recherche histochimique. Des méthodes valides existent pour l'identification des radicaux actifs des groupes latéraux et des groupes N-etC- terminaux: radicaux amino (résidu lysine et très accessoirement groupes NH_2 terminaux), guanidyl (résidu arginine), phénol (résidu tyrosine), indolyl (résidu tryptophane), sulfhydryle et disulfure (résidus cysteine et cystine). Des réactions permettent d'aborder l'étude physicochimique des protéines à l'échelle topochimique. Ce sont notamment celles qui dérivent du caractère électropolaire des protéines: détermination du nombre des radicaux basiques par l'évaluation de l'acidophilie "totale", détermination prétendûment du point isoélectrique.

C. *Méthodes permettant la différenciation des diverses protéines*

Les critères de classification et de différenciation usuels de la biochimie ne sont pas applicables à l'histochimie. Les méthodes topochimiques reposent surtout sur l'estimation des groupes latéraux et sur les caractères électropolaires.

CATOCHEMICAL STUDIES ON THE NUCLEI OF BACILLUS MEGATHERIUM

E. D. DELAMATER and P. ECHLIN

Section on Cytology and Genetics, Department of Physiology, School of Medicine. University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

Après avoir isolé les structures nucléaires de *Bacillus megatherium* en utilisant l'action des sels biliaires sur la cellule (dissection chimique), il était de grand intérêt de déterminer les effets spécifiques de ces détergents biochimiques et de mettre en évidence quelles substances chimiques disparaissaient de la cellule pendant et après l'action des sels biliaires. Il était également important de savoir quels effets cette dissection chimique pourrait avoir sur la structure du noyau et des chromosomes. Les RNA, DNA et les protéines ont été dosés et leur extraction de la cellule examinée dans les conditions dans lesquelles on isole les constituants nucléaires. En général les différents constituants cellulaires on pu être examinés d'une facon adéquate et on a pu montrer que le glycocholate de sodium ne paraissait pas affecter l'intégrité du noyau. L'usage des ultrasons pour l'extraction du noyau cellulaire modifie ce dernier même une fois qu'il a été séparé de la cellule. Cependant, en maintenant les vibrations pendant 15 secondes, on a pu obtenir une modification suffisante des constituants cellulaires tout en ayant une modification minime de ce dernier.

La méthode que l'on décrit ici, employée pour isoler le noyau bactérien et les chromosomes, semble ne causer que de minimes détériorations chimiques aux composants nucléaires. Elle constitue un procédé valable comme source de matériel pour une étude chimique et cytologique de ces structures.

THE STUDIES ON THE CELL NUCLEAR NUCLEPROTEINS WITH THE AID OF PHENOL FRACTIONATION PROCEDURE

G. P. GEORGIEV

A. N. Severtzov Institute of Animal Morphology.
Academy of Sciences of the USSR, Lenin avenue, 33, Moscow W 71 USSR

In the course of studying of some features of phenol deproteinization mechanism it was shown that the result of phenol treatment depends on the type of protein part of nucleoprotein complex and on the nature of the bond between nucleic acid and protein. After the treatment with phenol/0·14 M NaCl the major part of cytoplasmic RNA and nuclear sap RNA pass into the aqueous phase. DNA and nucleolar and residual chromosomal RNAs remain in the layer forming on the water phenol boundary. In this intermediate layer cell nuclei exist, which were further puriphied. Phenolic nuclei contain DNA, RNA and protein. Their composition is similar to the composition of nucleolar-chromosomal complex. The RNA content of phenolic nuclei correlates with the development of nucleolar apparatus of the parrent tissue. The treatment with phenol *pH* 7·3–7·4/0·14 M NaCl liberates DNA into the aqueous phase. The method for DNA isolation is based on this procedure. RNA of phenolic nuclei may be separated with phenol *pH* 6/H_2O or with phenol *pH* 7·3–7·4/0·14 M NaCl on two fractions: extractable RNA-E and non-extractable RNA-N. It was shown that incorporation of P^{32} *in vitro* into RNA-N of Ehrlich ascites carcinoma cells is 3–5 times as higher as into RNA-E and 40–80 times as higher as into high-polimeric cytoplasmic RNA (1 h incubation).

ENZYMATIC REMOVAL OF RIBONUCLEIC ACID FROM TISSUE SECTIONS AND ITS EFFECT ON THE BINDING OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID TO PROTEIN SITES IN THE CYTOPLASM

VIRGINIA C. LITTAU

The Rockefeller Institute, New York

LA COMPOSITION PROTÉIQUE ET NUCLÉIQUE DE STRUCTURES NUCLÉAIRES

I. B. ZBARSKY

A. N. Severtzov, Institut de morphologie animale
Académie des Sciences de l'URSS, Moscou, URSS

Par des extractions répétées et des colorations histochimiques de coupes fines congelées et de noyaux isolés par une méthode au saccharose-glycérophosphate, nous avons montré que la fraction globulinique extraite par le NaCl 0·14 M correspond au suc nucléaire, la fonction désoxyribonucléoprotéique extraite par le NaCl 1·5 M à la substance chromosomique, la fraction de la protéine acide, soluble dans les alcalis dilués - à la substance des nucléoles et des chromosomes résiduels. Ce dernier fait démontre l'identité de la composition des nucléoles et des chromosomes résiduels représentant un appareil unique. Le développement de l'appareil nucléolaire dans les noyaux des divers tissus correspond à la teneur en protéine acide. La protéine acide contient 10–20% d'ARN et ne contient pas d'ADN. Les fractions désoxyribonucléoprotéiques des divers tissus somatiques ont une composition similaire, contenant 35–40% d'ADN, et ayant environ 0·8 molécules des acides aminés basiques pour un atome de phosphore désoxyribonucléique.

LE PROBLÈME DE LA SIGNIFICATION DE LA CELLULE GLANDULAIRE GASTRIQUE DES VERTÉBRÉS NON MAMMIFÈRES. CONTRIBUTION HISTOCHIMIQUE

MARIA GABRIELLA MANFREDI ROMANINI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università
di Pavia e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

Chez les Vertébrés non Mammifères, l'épithélium glandulaire gastrique n'est pas constitué par les deux types cellulaires caractéristiques des Mammifères: les cellules délomorphes et les cellules adélomorphes.

Un type cellulaire unique forme la portion glandulaire de l'estomac: la cellule dite "cellule glandulaire gastrique" dont les caractéristiques ont été discutées selon des points de vue histomorphologiques et physiologiques.

Dans cette note nous tirons les conclusions possibles à ce sujet sur des bases histochimiques.

L'étude des protéines totales, de protéines se rattachant à des pepsinogènes (positives pour les réactions des indols), de l'ARN, des lipides solubles ou résistants dans l'alcool, effectuée sur la base d'amples comparaisons, dans de nombreuses espèces de poissons, d'amphibiens, de reptiles et d'oiseaux, et, parallèlement, dans les mammifères, indique clairement que partout la cellule glandulaire gastrique des vertébrés non mammifères sécrète de la pepsine, et est semblable en cela à la cellule adélomorphe des mammifères.

Cependant, les réactions des lipides et d'autres caractéristiques indiquent en même temps certaines concordances histochimiques même avec les cellules délomorphes des mammifères.

Ainsi se trouve renforcée au point de vue histochimique l'idée d'une "toute-puissance" fonctionnelle de la cellule glandulaire gastrique.

PRESENCE OF RIBONUCLEOPROTEINS IN MITOCHONDRIA OF DIFFERENT ANIMAL CELLS AND THEIR FUNCTIONAL IMPORTANCE

A. L. SCHABADASCH

The location of ribonucleic acid (RNA) or, more precisely, ribonucleoproteins (RNP) in cells, is considered usually in nucleolus and microsomes (e.i. ergastoplasm). Our studies carried on with the help of an improved histo-chemical method, careful control and selective substratum removal by ribonuclease digestion have undoubtedly shown, that RNP are contained in mitochondria of different cells: nervous epithelial, mesenchymal, blood and so on.

RNP of different organoids are characterised by different isoelectrical point (i.e.p.); typical i.e.p. zone, characteristic for RNP of mitochondria, is the lowest on the *pH* scale (with normal cells), further go nucleolus RNP and, finally, ergastoplasm. Certain categories of cells (f.e. afferent neurons, blood elements and other) have also diffusal RNP with an isopoint close to a free ribonucleic acid in their cytoplasm.

RNP of mitochondria play an important role in the cell biology, they regulate intermitochondrial ferments functioning conditions, participate in transphosphorylation reactions and synthesis processes of ferments – typical and located in these organoids. Life activity of cells and experimental influences are rapidly and accurately reflected through physico-chemical and morphological changes of RNP of mitochondria which are recorded by our cytochemical studies.

VERGLEICHENDE HISTOCHEMISCHE STUDIEN DER NUCLEOPROTEIDE IN DEN ROTEN BLUTZELLEN DER WIRBELTIERE

G. RAPPAY

Institut für Experimentelle Medizin der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Morphologische Abteilung, Budapest

Die histochemische Untersuchung der Nukleoproteide trat in der letzten Zeit in den Vordergrund des Interesses. Bei der Analyse der vielsitigen experimentellen Daten tauchte die Frage der Spezifität der Nukleinsäuren auf. In unseren Untersuchungen wurde die Frage aufgeworfen, ob wir im Verlauf der Phylogenese mit der Veränderung der Nukleoproteide rechnen können und ob diese Veränderungen mit den gewöhnlichen histochemischen Methoden nachgewiesen werden können? Zur Untersuchung dieser Frage wurden Erythrozyten der verschiedenen Tierarten (Fische, Amphibien, Reptilien und Vögel) verwendet. Diese Zellen wurden mit Säuren (n HCl, Perchlorsäure) und mit proteolytischen Enzymen behandelt. Nach der Behandlungen wurden die Praeparate mit Methylgrün-Pyronin, mit Toluidinblau, mit Tetrazonium-Kupplungsreaktion von Danielli und nach Feulgen gefärbt. Mit diesen Färbungen untersuchten wir die Resistenz der Nukleoproteidkomplexe den Säuren und proteolytischen Enzymen gegenüber. Es wurde festgestellt, dass der Pyronin-Umschlag sich in den Zellkernen der phylogenetischen Reihe entsprechend verändert, die Erythrozytenkerne nach den beiden Behandlungen eine starke Metachromasie zeigen, die Erythrozytenkerne sich dem Trypsin un Pepsin gegenüber anders verhalten. Aus diesen Ergebnissen können wir folgern, dass die Nukleoproteide der verschiedenen Erythrozyten sich im Verlauf der Phylogenese verändern. Die Veränderungen dürften zur Ausbildung stabilerer Verbindungen zwischen den Nukleinsäure- und Eiweissmolekeln führen.

SOME ASPECTS OF THE BEHAVIOUR OF NUCLEAR RNA AND PROTEIN

J. L. SIRLIN, K. KATO and K. W. JONES

Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9

The turn-over of nucleic acids precursors offered *in vitro* into both transfer RNA and higher molecular weight RNA in the salivary gland nucleus of the chironomid *Smittia* will be described as revealed by autoradiography. Similarly, the turn-over of amino acid into both transfer RNA and protein will be described. With these observations some aspects of the participation of the various nuclear components in the system for protein synthesis of the cell will be discussed.

HISTOCHEMISTRY OF INTRACELLULAR POLYSACCHARIDE SYNTHESIS

T. TAKEUCHI

Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

Histochemical mechanisms of intracellular glycogen synthesis were discussed and two major pathways utilizing the amylophosphorylase→branching enzyme system and the UDPG-pyrophosphorylase→UDPG-glycogen transferase system were demonstrated histochemically. The specificity of the histochemical demonstration of each enzyme and the methodology used in its demonstration were described.

ÉTUDES HISTOCHIMIQUES DE L'ACTIVITÉ PHOSPHORYLASIQUE. MISE EN ÉVIDENCE PAR L'ACTIVATION DE LA PHOSPHORYLASE KINASE

S. GUHA et R. WEGMANN

Institut d'Histochimie Médicale, Faculté de Médecine, Paris

Une nouvelle méthode pour la mise en évidence de la phosphorylase dans le foie et dans d'autres organes nous a permis d'étudier cette activité dans les différentes conditions expérimentales.

Cette méthode est basée sur l'activation de la phosphorylase-kinase, l'enzyme qui transforme la forme inactive de la phosphorylase en forme active, en présence de l'ATP et de Mg^{++}, et en même temps la phosphorylase phosphatase (P R enzyme), enzyme inactivateur de la phosphorylase, est inhibée par le fluorure de sodium.

Cette technique permet d'éliminer l'incertitude et l'irrégularité de cette réaction dans quelques organes.

En employant cette technique, l'activité phosphorylasique peut être decelée dans le foie de toutes les espèces étudiées. D'ailleurs, cette technique révèle l'existence de la phosphorylase-kinase dans d'autres organes tels que le muscle strié, l'utérus, le myocarde, le cerveau, le cartilage, la peau, le rein et la cornée. L'effet des fixateurs d'enzymes a été étudié sur les tissus en bloc, et sur les coupes fraiches. Dans les coupes fraiches seulement, l'alcool et l'acétone conservent une activité considérable. Toutes les variantes de formol détruisent cet enzyme.

L'activation de la phosphorylase inactive par le 3-5-cyclique AMP a été observée. La phosphorylase active est activée davantage par l'AMP.

L'activation des différentes formes de phosphorylase par la protamine, en présence et en l'absence d'AMP a fait l'objet de nos études.

L'inhibition de la phosphorylase par le parachloromercurobenzoate (PCMB) n'a pu être prouvée dans les conditions histochimiques. Mais la participation du groupe -SH à l'action de la phosphorylase est prouvée par l'étude de l'inhibition par l'acide monoiodacétique.

Les expériences destinées à montrer les effets des agents réducteurs ont fait l'objet d'une série d'essais importants. Les causes probables des différences histochimiques avec les résultats obtenus par les études biochimiques sont envisagées.

Le rôle du "primer" joué pa le glycogène endogène est également envisagé.

LE GLYCOGÈNE DU CORTEX SURRENAL: NOUVEAU CRITÈRE HISTOCHIMIQUE D'ACTIVITÉ FONCTIONNELLE

H. PLANEL et A. GUILHEM

A côté des composés biochimiques étudiés classiquement dans le cortex surrénal, le glycogène, décelable histochimiquement chez de nombreuses espèces par la méthode du PAS, permet par ses variations d'apprécier l'activité fonctionnelle du cortex surrénal.

Chez le rat albinos, le glycogène est représenté par de fins granules, disséminés essentiellement dans la zone fasciculée et dans la zone réticulée externe. Une surcharge glycogénique s'observe, dans les trois zones, après administration prolongée d'ACTH ou dans le stress, après injections répétées de formol. Une même surcharge s'observe, chez le rat, le cobaye et la souris après administration de cortisone. Inversement, une activation courte, secondaire à une ou deux injections d'ACTH, s'accompagne d'une déplétion glycogénique importante; cette déplétion s'observe chez l'animal normal et chez l'animal préalablement traité par la cortisone.

On conclut, de ces expériences, qu'une surcharge glycogénique est une signe d'hypocorticisme alors qu'une charge glycogénique faible est un critère histochimique d'activité fonctionnelle.

THE EFFECT OF VARIOUS SOLVENTS AND OTHER CONDITIONS ON PERIODATE OXIDATION OF CARBOHYDRATES IN THE PAS REACTION

J. F. A. McMANUS

A variety of solvents have been investigated with the periodic acid Schiff (PAS) reaction for 1, 2 glycols in tissue sections. Some variability was found in a number of substances staining in tissue according to the solvent used and the extent of the staining. Substances showing a different staining according to the solvent included corpora amylacea, the ground substance of cartilage and bone and the aging (wear and tear pigment) of heart muscle. The solvents used were distilled water, ether, chloroform, glacial acetic acid and phosphate buffers from *pH* 3·5 to *pH* 11·0. Corpora amylacea was stained by Schiff's reagent much better after oxidation by periodic acid in ether than after oxidation in any other solvent. The same is true of the ground substance of cartilage and bone but the superiority of ether over glacial acetic acid as a solvent for the periodic acid was not so striking as in the case of corpora amylacea. The wear and tear pigment of heart muscle stained best with aqueous periodate. Other conditions of oxidation will be discussed and demonstrated.

SOME ASPECTS OF CARBOHYDRATE METHABOLISM OF THE TRANSITIONAL EPITHELIUM

A. J. FRIEDENSTEIN

Moscow, USSR

The transitional epithelium is osteogeneticalley active in the experimental conditions. This activity consists histochemically in the excretion on the epithelium of polysaccharides which signs the glycogen. It takes place at the moment of the induction. At the normal differentiation the polysaccharides of the transitional epithelium are in the reciprocal relations with the unspecific alkaline phosphatase. The distribution of the phosphorylase in such epithelium allows us to suppose that the phosphatase of this tissue dephosphorylising the Cori's ester acts in the direction opposite to glycogen synthesis. While dealing with different ways of differentiation of the transitional epithelium (keratinisation, mucin secretion) the glycogen is seemingly utilised for the construction of acid mucopolysaccharides which are associated with cystein or are parts of mucin. In the case of incomplete differentiation when the transitional epithelium is osteogenetically active there appears the glycogen secretion directed under and over the epithelial layer and the activity of phosphatase is decreased. This secretion as well as that of the epithelium of renal collecting tubes is strengthened under the influence of pituitrin. The product of this secretion ("pelvin") contains glycogen and is specificaly histogenetically active. In conclusion the role of polysaccharides of the urinary tract in the histogenetical regulation is discussed.

L'APPLICATION DE L'ACIDE DE L'ÉTHYLÈNEDIAMINE TATRACETIC (EDTA) À L'ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES PHOSPHORYLASES ET DES "BRANCHING ENZYME"

H. G. GODLEWSKI

L'Institut d'Oncologie, Laboratoire de Biologie
des Tumeurs, Gliwice, Pologne

Au cours de la réaction de Takeuchi et Kuriaki (1955), Takeuchi (1958) effectuée sur des coupes fraiches, de foie et d'utérus du rat faites au cryostat, on a pu souvent constater des différences d'intensité des réactions, malgré qu'elles aient été exécutées chaque fois dans des conditions identiques. La diminution de l'activité de l'enzyme est probablement due au changement spontané de phosphorylase b en phosphorylase a (Fischer et Krebs 1958); cette dernière forme n'a pu être d'ordinaire démontrée au moyen d'un procédé histochimique, mais l'est depuis que Wegmann et Guha ont mis au point une réaction spécifique (1959).

Afin de bloquer cette conversion spontanée on a decidé de chélater les ions magnésium tissulaire à l'aide de l'EDTA. L'EDTA ajoutée au substrat à la concentration finale 0,001 M augmente l'intensité de réaction des phosphorylases en comparaison aux coupes de contrôle incubées dans le substrat sans EDTA. La réaction du "branching enzyme" n'est soumise, comme il semble, à aucun changement.

HISTOCHEMICAL STUDIES ON LIVER POLYSACCHARIDES

LUCILLE BITENSKY, ROSEMARY ELLIS,
J. CHAYEN and A. A. SILCOX

Department of Pathology, Royal College of Surgeons,
Lincoln's Inn Fields, London

Enzyme studies on experimental liver tumours indicated that the endogenous respiration of certain cells was unusually high. This suggested an intracellular store of carbohydrate but the usual staining methods failed to reveal such a store in controlled temperature frozen sections, apparently owing to loss of polysaccharide during fixation. Moreover, the conventional fixatives did not produce ideal results even for routine diagnostic inspection.

An investigation will be reported in which the effects of alcohol, salt concentrations and picric acid on mucus, on intracellular water soluble carbohydrate and on cell structures have been studied. This has permitted the demonstration of labile polysaccharide in those cells which showed high endogenous respiration. It is expected that the sectioning method together with this fixation mixture will permit sections to be cut and stained very rapidly and yet to yield results at least comparable to those obtained by routine histological procedures.

DEVELOPMENTAL HISTOCHEMISTRY: INTRODUCTION OF NEW METHODS FOR LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY BY THE DESIGN AND PREPARATION OF APPROPRIATE REAGENTS AND SUBSTRATES

A. SELIGMAN

The historical features of the evolution to the present state of perfection is briefly summarized for acid phosphatase, esterase, leucine aminopeptidase, succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. It was shown that the major advance in methodology was accomplished by design and synthesis of appropriate reagents to fulfill the stringent requirements of morphological histochemistry and cytochemistry.

HISTOCHEMICAL ENZYME TECHNICS APPLIED TO STARCH GEL ELECTROPHORESIS

P. J. MELNICK and S. H. LAWRENCE

From the Clinical Laboratory Service, and Biochemistry Research Laboratory, Veterans Administration Hospital, San Fernando, California, U.S.A.; and the Departments of Pathology and Infectious Diseases, University of California, Los Angeles, California, U.S.A.

Histochemical technics were adapted for use in starch gel electrophoresis to demonstrate the following 8 enzymes: aminopeptidase, betaglucuronidase, cytochrome oxidase, cholinesterase, succinic dehydrogenase, lactic dehydrogenase, beta-hydroxybutyric dehydrogenase, and glutamic dehydrogenase. Also, 3 reported technics (esterase, and acid and alkaline phosphatases) were adapted for human serum in starch gel electrophoresis. The patterns of these 11 enzymes were then studied with this medium in human serum, the serum of 6 other mammalian species, several normal human tissues (heart, liver, kidney, spleen, adrenal and brain), and a number of human malignant tumors (5 cases of carcinoma of the breast, carcinoma of the prostate, reticulum cell sarcoma, and parotid mixed tumor). Most of the enzymes were composed of several discrete components. The effect of inhibitors were studied on some of the separate enzyme bands, such as eserine on cholinesterase and tartrate and formalin on the acid phosphatases.

INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF "THIOLACETIC ACID ESTERASE" AND OF NONSPECIFIC ESTERASE

M. WACHSTEIN and E. MEISEL

Department of Pathology St. Catherine's Hospital,
Brooklyn, New York, U.S.A.

A QUANTITATIVE CRITIQUE OF GOMORI'S HISTOCHEMICAL METHOD FOR PHOSPHAMIDASE

W. B. ATKINSON and G. H. HERBENER

Department of Anatomy, University of Louisville
School of Medicine. Louisville 2. Kentucky, U.S.A.

LA LOCALISATION CYTOCHIMIQUE DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PROTÉINES CELLULAIRES ET LA DÉTERMINATION DE LEUR MODE D'ASSOCIATION

HELEN GAY

Les méthodes cytochimiques, comprenant la digestion par les nucléases et les protéases, la dégradation par d'autres agents chimiques, et par différents procédés de coloration, ont été employées pour localiser les acides nucléiques et les protéines, et pour déterminer leur mode de liaison dans les cellules des plantes et des animaux supérieurs. La majeure partie de nos observations a été réalisée sur les chromosomes de la glande salivaire de la Drosophile. Les résultats indiquent que les chromosomes contiennent de l'acide desoxyribonucléique (ADN), de l'acide ribonucléique (ARN), des histones et des protéines non-histones. Ces substances généralement se présentent sous forme de nucléoprotéines conjuguées. Nous démontrerons cependant que la protéine non-histonique peut être associée avec de l'ADN, et l'histone avec de l'ARN. Nous avons aussi étudié la combinaison de ces deux espèces de nucléoprotéines entre elles. Nous parlerons de nos premières évidences cytochimiques – confirmées plus tard par des méthodes biochimiques – c'est à dire que l'ARN peut être intercalé le long des chaînes de l'ADN dans les chromosomes. Les résultats obtenus dans ces études cytochimiques suggèrent que les acides nucléiques et les protéines consistent en un tissu intégré dans lequel nulle substance, telle que l'ADN, n'est responsable de l'unité du chromosome. Selon cette hypothèse, nous pouvons vous présenter des faits les plus récents, obtenus par l'analyse de l'hydrolyse enzymatique des noyaux non-fixés, et par l'autoradiographie de la H^3-thymidine.

Ce travail fut réalisé avec l'aide de la Research Grants (RG–149 and 5336) provenant du National Institutes of Health, U. S. Public Health Service.

METHODS FOR CYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NUCLEAR BASIC PROTEINS AND THEIR APPLICATION TO PROBLEMS IN DEVELOPMENT

D. P. BLOCH and H. Y. C. HEW

Department of Zoology, University of California, Los Angeles, California

Four types of basic nuclear proteins can be distinguished on the basis of their staining characteristics. The original method of Alfert and Geschwind, utilizing trichloracetic acid hydrolysis of DNA and subsequent staining of the unmasked basic proteins with fast green at high *pH*'s, results in the staining of most histones, including arginine-rich histones of many sperm and spermatid cells. Blocking of lysine by acetylation or by deamination results in the loss of staining of all but those arginine-rich histones of sperm and spermatids. Protamines of sperm are lost during the above procedures, but can be demonstrated by use of picric acid hydrolysis for removal of DNA and staining with eosin at high *pH*'s. Picric acid and eosin in succession form insoluble complexes with the protamine, and the latter is not bleached from the cell during staining. Picric acid hydrolysis, followed by staining with bromphenol blue under acid conditions, and differentiation in alkaline ethanol, results in the staining of faintly basic nuclear proteins in the cleaving eggs of a number of organisms. These "histones" do not otherwise stain. The possible significance of these findings will be discussed.

LES PROTÉINES DES NOYAUX ET DES NUCLÉOLES

C. POORT

Utrecht

Comme l'a été rapporté antérieurement (Poort 1957), il est possible de préparer des noyaux très purs du pancréas de boeuf dans un milieu de glycerine-phosphate.

La même technique un peu modifiée a pu être appliquée à l'isolement de noyaux du pancréas de rat.

Les nucléoles sont isolés, à partir d'une préparation de noyaux. La libération des nucléoles à partir des noyaux du pancréas de boeuf a lieu dans un milieu visceux, à l'aide d'un homogénisateur de Bühler.

D'autre part, les nucléoles du pancréas de rat ne pouvaient être d'obtenus qu'après l'utilisation d'un appareil de notre propre construction. Les nucléoles peuvent être concentrés sans difficultés parce que la densité de ces particules est plus grande que celle des autres éléments nucléaires.

Les noyaux ainsi que les nucléoles ont été successivement extraits par 0·14 M NaCl, 1 M NaCl et 0·1 M NaOH. L'attention a été dirigée surtout vers les extraits de 0·14 M NaCl et 0·1 M NaOH.

La quantité du matériel étant très petite, il a été nécessaire de développer une technique spéciale pour l'extraction des nucléoles provenants du pancréas de rat.

Les extraits ont été soumis à une électrophorèse sur papier ou dans gélose, dépendant du volume des extraits obtenus.

Il se trouvait, que dans le pancréas des deux espèces d'animaux étudiés, les protéines des nucléoles sont nettement différentes des protéines contenues par le reste des noyaux.

(Poort C.: A new homogenizer for the isolation of nuclei in concentrated glycerine. *Biochim. Biophys. Acta* 1957, 25: 32–34).

LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE LA SOLUBILITÉ DES PROTÉINES DES TISSUS APRÈS LA FIXATION PAR DES MOYENS CHIMIQUES ET PHYSIQUES

K. OSTROWSKI, J. KOMENDER, K. KWARECKI

La détermination quantitative de la solubilité des substances composant les tissus au cours des procédés histologiques est nécessaire pour l'histochimie quantitative.

De nombreux travaux (Kaufmann 1948, Masucci 1949, Gomori 1950, Sylvén 1952, Sandritter *et coll.* 1955, Lagerstedt 1956 et 1957, Hartleib *et coll.* 1956, Stenram 1958, Neumann 1958) ont été consacrés au problème de la solubilité des acides nucléiques et des protéines. Les résultats diffèrent de l'un à l'autre, ce qui est le résultat de l'application de différentes méthodes histologiques et chimiques.

Nous avons examiné uniquement l'influence de la fixation sur la solubilité des protéines en omettant, pour simplifier les choses, l'influence de l'ensemble de la procédure histologique. Les reins et le foie de rats blancs ont été fixés dans de l'éthanol absolu, dans du formol, dans de l'acétone par lyophilisation et par la méthode de "freeze—substitution". Les protéines étaient extraites par l'eau distillée et leur quantité déterminée par la microméthode de Kjeldahl. Les résultats sont présentés sur le tableau ci-dessous:

	La quantité de protéines (mg) pour 1 mg de tissu frais.					
	Tissu frais	Ethanol absolu	10% Formol	Acétone	Freeze--subst.	Lyophilisation
Foie	0·068± ±0·009	0·025± ±0·003	0·003± ±0·001	0·036± ±0·004	0·079± ±0·012	0·092± ±0·025
Rein	0·074± ±0·014	0·025± ±0·004	0·003± ±0·001	0·054± ±0·009	0·081± ±0·012	0·089± ±0·016

Les auteurs envisagent les moyens de mesures de l'azote des protéines.

THE DETERMINATION OF SULFHYDRYL GROUPS OF PROTEINS BY MEANS OF THE INHIBITORY-INDICATOR (BROMOACETYLNITRO-BENZOIC ACID) METHOD

I. B. KRASNOV

Laboratory of Histochemistry, Institute of Brain Research Academy of Medical Sciences of USSR

Most of the reactive agents used for developing the sulfhydryl groups require for dissolution the presence of spirit in the reactionary medium. The concentration of spirit in the reactionary medium is such that produces the denaturation of proteins and therefore the reactive agents mentioned above cannot be used in conditions of a physiological experiment. This can also be applied to histochemical reaction for the determination of SH-groups which are founded on the formation of mercaptides. As a result of it moreover, compounds are formed which are not firmly connected. There arose a necessity of creating a reactive agent which could be dissolved in an aqueous medium and could react which sulfhydryl groups specifically and irreversibly at physiological figures of *pH*. Bromoacetylnitrobenzoic acid first syntesised and described by us has all these properties. The use of solutions of bromoacetylnitrobenzoic acid prepared on the solution of Ringer-Locke or Tyrode makes it possible when registering, the physiological conditions of the investigated tissue and successive histochemical treatment clearly to define the localisation of SH-groups responsible for the rise of physiological effects. An investigation of the localisation of SH-groups of receptive proteins of ganglion cervical superior of the cat has been carried out. The possibility of the use of bromoacetylnitrobenzoic acid for the specific development of sulfhydryl groups of proteins in the conditions of usual histochemical investigation as well as of the quantitative determination of SH-groups of tissue proteins which can be dissolved in water has been shown.

CHARACTERIZATION OF NINE TYPES OF RIBONUCLEOPROTEIN IN THE CELL BY THE TOLUIDINE BLUE-MOLYBDATE STAIN

R. LOVE and R. G. SUSKIND

Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda 14, Maryland

Differential staining by toluidine blue-molybdate depends upon: a) Differences in the susceptibility of amino groups of nucleoproteins to inactivation by formaldehyde and nitrous acid. b) Binding of toluidine blue by the phosphoryl groups of nucleic acids at *pH* 3·0. c) Production of a metachromatic toluidine blue-polymolybdate complex at some sites of dye-binding. During the course of inactivation of protein-bound amino groups three different stages of staining by TBM have been produced and seven types of ribonucleoprotein (RNP) have been demonstrated. Very short fixation results in a fourth stage of staining in which two further forms of RNP are recognizable. The nine forms of RNP differ in morphology, in staining properties and in functional behavior. There are two forms of diffuse cytoplasmic and of chromosomal RNP; one form is unaltered while the other undergoes cyclical changes during mitosis. Peri-chromosomal and granular cytoplasmic RNP, granular and amorphous parachromatin and the RNP of the pars amorpha of the nucleolus all undergo a series of changes in mitosis. The granular and the amorphous parachromatin appear to be functionally different; both are extrachromosomal in the interphase nucleus, increase in amount during prophase, are liberated into the cytoplasm at the onset of metaphase and are not included in the telophase daughter nucleus. The granular form disperses freely into the entire cytoplasm at the end of prophase. The amorphous parachromatin diffuses only into the spindle area and may constitute an RNA template for the formation of the protein of the spindle fibres. Colchicine prevents the diffusion of amorphous parachromatin into the spindle zone.

NEW HISTOCHEMICAL METHODS FOR THE DEMONSTRATION OF PROTEIN-BOUND TRYPTOPHAN AND TYROSINE: A CRITIQUE AND EVALUATION

G. G. GLENNER

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.

Within the last three years the introduction of new histochemical techniques for the demonstration of protein-bound tryptophan and tyrosine have made possible sensitive, specific and permanent localization of proteins containing these amino acids in tissue sections. Because of their high specificity, these new histochemical methods have elevated to a prominent position the demonstration of proteins in tissues by means of their amino acid constituents.

With the benzylidene condensation reaction as the basis for the demonstration of the indole ring, two important methods for the localization of protein-bound tryptophan in tissue sections have been established. The first of these is the "post-coupled benzylidene" reaction and the second, the "rosindole" or "carboline" reaction. The "post-coupled benzvlidene" reaction makes use of a freshly prepared diazonium salt to increase the color of the initial benzylidene condensation product by a post-coupling reaction. The "rosindole" or "carboline" reactions utilize an oxidant to produce a stable blue dye from the initial benzylidene product. It appears that the only difference between the "rosindole" and "carboline" reactions is the solvent and proportion of condensing agent to solvent in the benzylidene reaction medium. However, this difference in solvent and solvent condensing agent ratio appears to affect the reaction sensitivity. From experimental evidence it appears that in demonstrating sites not shown by the "carboline" method, the "rosindole" technique is solubilizing less protein from tissue sections and, therefore, appears to be more sensitive.

The methods for protein-bound tyrosine depend on the nitrosation of tyrosine with simultaneous chelation of the ortho nitrosotyrosine with various cations to produce a color reaction. In the absence of these cations further exposure to nitrous acid produces an ortho-diazotyrosine

which has been found to be photosensitive. This compound is coupled to a suitable coupling component to produce a dark colored azo dye at sites of protein-bound tyrosine in tissues. A variant of this method, which uses the production of an o,o'-dihydroxy azo dye from the coupling of diazotyrosine to naphthoresorcinol, can be shown to convert into a deeply colored chelate complex upon the addition of suitable cations. Comparison of the methods of diazotization-coupling with other similar techniques appears to demonstrate for all these methods a specificity for protein bound tyrosine. The experimental evidence leading to this conclusion is presented.

An evaluation of these techniques in regard to their sensitivity and specificity reveals that interpretation of results must be predicated upon the inherent capacity of the reaction to solubilize specific proteins and the knowledge that these "end-group" reactions may localize phenolic or indolic compounds other than tyrosine and tryptophan. The conclusions derived from the experimental use of these reactions is evaluated.

LES RÉACTIONS COLORÉES POUR LA DÉTECTION DES MUCOPOLYSACCHARIDES INTERPRETÉES À LA LUMIÈRE DE L'AUTORADIOGRAPHIE DU RADIO-SULFATE SYNTHÉTISE IN VIVO ET DU RADIO-CALCIUM ADSORBÉ IN VITRO

L. F. BÉLANGER et B. B. MIGICOVSKY

Départament d'Histologie et Embryologie,
Université d'Ottawa et Institut des Recherches Animales,
Ministère de l'Agriculture, Ottawa, Canada.

1. L'autoradiographie du $sulfate^{35}$ administré in vivo chez le poulet normal de trois semaines, fait voir la synthèse, la sécrétion et le transport d'une substance soufrée à partir de régions définies du cartilage. Le taux de synthèse décroît avec le rachitisme et augmente avec l'administration de vitamine D.

2. L'autoradiographie du Ca^{45} adsorbé *in vitro* montre le radio-élément dans les zones où l'on retrouve le fer après la réaction de Hale. L'incorporation dans les deux cas répond probablement à des mécanismes comparables. Le rachitisme amène une accumulation de substance captante pour ces deux cations. Le potentiel de captation du cartilage rachitique décroît rapidement en présence de la vitamine D.

3. La réaction de Hale indique probablement la présence de groupements sulfate libres auxquels serait lié le pouvoir de captation.

4. La coloration au bleu de toluidine démontrent, en plus de ceux-ci, des substances à groupements sulfate saturés, localisés dans la zone des grandes cellules, où se déposent les sels minéraux.

5. La coloration à l'Alcian Blue 8 GS de même que la réaction au P.A. Schiff ne semblent pas liées à la présence des groupements SO_4. L'une et l'autre démontrent peut-être la présence de précurseurs.

DIFFÉRENCIATION HISTOCHIMIQUE DE PLUSIEURS TYPES DE MUCOPOLYSACCHARIDES SULFATÉS CHEZ LES RONGEURS

S. S. SPICER

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. U. S. A.

Des recherches exécutées dans un nombre de laboratoires au moyen du procédé autoradiographique ont démontré l'incorporation du $Na_2S^{35}O_4$ dans les mucopolysaccharides sulfatés. Ce procédé a permis d'identifier de nombreuses mucines sulfatées chez les rongeurs. Lorsqu'on compare les manières différentes dont les mucines sulfatées réagissent au traitement histochimique, on trouve qu'elles forment plusieurs groupes doués de propriétés caractéristiques.

Parmi les mucines déjà étudiées, seules capables de se colorer à l'azur A au 0·02 pour cent dans du N HCl (*pH* 0·5) sont celles qui se trouvent dans la substance fondamentale du cartilage, dans les labrocytes, dans les glandes glosso-pharyngiennes du lapin, ainsi que dans les cellules caliciformes du revêtement du côlon. Par contre, celles qui sont azurophiles à un *pH* 0·5 sont les seules mucines acides dépourvues d'affinité pour le bleu d'alcian.

Si les coupes de tissu ont été artificiellement sulfatées au préalable par le procédé Kramer-Windrum, les mucines acquièrent la capacité de donner une réaction à l'azur A, a un *pH* 0·5 et perdent leur affinité pour le bleu.

Après l'élimination par traitement à l'acide de méthanol des esters de sulfate naturels, qui sont inertes envers le bleu d'alcian, les mucines acquièrent une affinité pour le bleu d'alcian. Une élimination semblable des esters de sulfate artificiels, qui ne donnent pas de réaction au bleu d'alcian, communique aux mucines normalement capables de donner cette réaction une affinité pour le colorant en question.

Une série combinée de traitements au bleu d'alcian et à la safranine fait ressortir un manque d'affinité pour ce premier colorant avec une clarité particulière, en tant que les mucines sulfatées résistantes au bleu d'alcian se colorent en rouge, tandis que les autres mucines acides se colorent sans exception en bleu.

Un autre groupe de mucopolysaccharides sulfatés, particulièrement ceux du type qu'on trouve dans les glandes glosso-pharyngiennes et les

cellules caliciformes du revêtement du côlon transverse dans la souris, dans le rat et dans le cobaye, donnent une réaction à l'azur A a un *pH* 1·5. Cette réaction est caractérisée par une métachromasie variable et le fait que le bleu d'alcian produit une coloration très forte.

Les cellules caliciformes dans l'intestin grêle et dans le côlon sigmoïde, ainsi que les cellules folliculaires profondes, chez la souris et le rat, d'autre part, réagissent fortement au bleu d'alcian, mais à l'azur A ne réagissent du tout ou seulement lorsque le *pH* est au-dessus de 2·5. Une série de traitements combinant la coloration à la fuchsine d'aldehyde et ensuite au bleu d'alcian laisse la plupart des mucines sulfatées colorées en violet et les mucopolysaccharides acides nonsulfatés, tels par exemple que les sialomucines, en bleu. Néanmoins, on connaît des exceptions à cette règle, les mucopolysaccharides qu'on trouve dans le duodénum et le côlon sigmoïde du rat, qui sont faiblement positifs envers l'azur A et qui donnent une coloration bleue sous l'action d'une série de traitements à la fuchsine d'aldehyde et au bleu d'alcian.

Certaines mucines sulfatées, telles que celles qui se trouvent dans les glandes glosso-pharyngiennes et dans les cellules caliciformes du revêtement intestinal du lapin, paraissent contenir des esters de sulfate sur les hydroxyles vicinaux, puisqu'elles acquièrent le pouvoir de donner la réaction acide de Schiff (PAS) après l'extraction des esters de sulfate par l'acide de méthanol. Les mucines normalement PAS positives perdent une telle coloration après sulfatation artificielle de la coupe et la retrouvent après avoir été traitées à l'acide de méthanol,

LES MUCOPOLYSACCHARIDASES DU TISSU CONJONCTIF

H. GIBIAN
Berlin-West, Allemagne

Les acides chondroitine-sulfuriques et l'acide hyaluronique sont les composants les mieux connus des substances fondamentales du tissu conjonctif. Elles sont relativement vite renouvelées par le métabolisme. Leur décomposition dans le tissu pourrait commencer par une hydrolyse fermentative. Les ferments en question seraient alors, suivant la définition des mucopolysaccharidases, analogues à l'hyaluronidase testiculaire bien connue.

Au cours de la recherche de tels ferments on se sert surtout de méthodes physico-chimiques; celles-ci ne permettent de donner souvent, qu'après des contrôles assez laborieux, des résultats sûrs sur le mécanisme de la réaction en question. En effet on a trouvé par telles méthodes dans de nombreux tissus et même dans le sérum et d'autres liquides du corps des "facteurs décomposant l'acide hyaluronique"; leur activité dépend de l'organe et de l'espèce. Il est assez certain qu'ils sont différents de l'hyaluronidase testiculaire; une caractérisation plus détaillée manque jusqu'à présent.

On ignore dans quelles limites la concentration de ces ferments dans le tissu est influencée par les conditions physiologiques, pathologiques ou expérimentales. Donc leur participation dans le métabolisme des acides mucopolysaccharidiques du tissu conjonctif est complètement hypothétique; des conclusions concernant la pathogénèse de certaines maladies du tissu conjonctif sont certainement inadmissibles.

On a parfois tiré des conclusions de certaines expérimentations avec l'hyaluronidase testiculaire et avec des agents pharmacodynamiques inhibiteurs. Ceci egalement est inadmissible, vu les différentes qualités de l'hyaluronidase testiculaire et des facteurs du tissu.

CONTRIBUTION À LA CONNAISSANCE DES SUBSTANCES MUCOPOLYSACCHARIDIQUES ET DU GLYCOGÈNE DANS L'ÉPITHÉLIUM DE LA MUQUEUSE RESPIRATOIRE NASALE NORMALE ET DANS LA MUQUEUSE EN PROIE À DES PHÉNOMÈNES DYSPLASIQUES PAR SUITE D'INFLAMMATIONS CHRONIQUES ASPÉCIFIQUES

V. A. BORIANI

Clinique oto-rhino-laryngologique de l'Université
de Pavie et Centre d'Étude pour l'Histochimie du C.N.R.
de l'Université de Pavie

L'Auteur a effectué une étude histochimique sur les substances mucopolysaccharidiques et sur le glycogène de l'épithélium nasal normal et de l'épithélium présentant des dysplasies dues à inflammation chronique aspécifique.

Pour mettre ces substances en évidence l'Auteur a utilisé les réactions de Bauer, de Hotchkiss (précédée quand cela était nécessaire par la digestion enzymatique au moyen de salive), de la coloration au bleu d'Alcian 8 GN, des réactions multiples bleu d'Alcian-Hotchkiss et Hale-Hotchkiss; la métachromasie a été recherchée à l'aide du bleu de toluidine en solution aqueuse à des concentrations différentes.

Dans l'épithélium de la muqueuse nasale respiratoire normale, l'A. a observé la présence de mucopolysaccharides surtout neutres dans les cellule caliciformes; le glycogène est presque complètement absent des cellules de toutes les couches de l'épithélium. Au cours de rhinites hypertrophiques chroniques l'épithélium augmente généralement d'épaisseur, tout en conservant sa morphologie; dans ce cas on note une augmentation du nombre et des dimensions des cellules caliciformes, montrant une augmentation quantitative du taux des mucopolysaccharides acides, à la réaction de Alcian-Hotchkiss.

Au cours de rhinites atrophiques dues a l'ozène, dans un premier temps on note la disparition des cellules caliciformes et l'absence des mucines épithéliaux; par la suite, quand l'épithélium présente des phénomènes de métaplasie, apparaît dans le cytoplasme des cellules des couches intermédiaires, une substance Bauer et Hotchkiss positive, digérée par la

salive et que l'on peut donc considérer comme du glycogène ou comme une substance semblable.

On observe aussi, dans les couches superficielles, une substance Bauer et Hotchkiss positive, qui ne peut pas être digérée par la salive, et qui donne également un résultat positif aux réactions pour les groupes SS et SH; on en vient à penser qu'il s'agit d'une substance glycoprotéique.

CONTRIBUTION À LA CONNAISSANCE DES SUBSTANCES MUCOPOLYSACCHARIDIQUES DANS L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIQUE HUMAIN, DANS LES CONDITIONS NORMALES ET DANS DES CONDITIONS PATHOLOGIQUES

M. GANDOLFI

Institut d'Anatomie Comparée et Centre d'Histochimie du C.N.R.
et Clinique Oto-rhino-laryngologique

Grâce à l'application de nombreuses réactions aptes à mettre en évidence les mucopolysaccharides — r. de Hotchkiss, r. de Bauer, coloration au bleu d'Alcian 8 GN, r. de métachromasie, r. de Hale — à l'étude des formations bronchiques qui produisent le mucus, l'Auteur fournit certaines données cytochimiques permettant de s'orienter au sujet de ce phénomène complexe qu'est la "sécrétion bronchique", et dont on connaît l'importance, tant dans les conditions physiologiques que dans les conditions pathologiques. Dans ce genre de recherches, s'est révélée particulièrement utile la réaction double combinée bleu d'Alcian-Hotchkiss, proposée par Vialli, qui permet de mettre immédiatement en évidence la teneur diverse en mucopolysaccharides neutres ou acides des éléments glandulaires tant unicellulaires que pluricellulaires, révélant ainsi des variations dans la composition du mucus intracellulaire. Après avoir schématiquement illustré la distribution des substances mucopolysaccharidiques dans la muqueuse bronchique humaine normale, et l'existence probable d'un crinocyle dans la sécrétion du mucus (en ce sens que l'on peut considérer le mucus le plus acide, contenant une plus grande quantité de mucopolysaccharides acides, comme le produit final), nous traçons les tableaux que l'on peut observer dans les conditions pathologiques. Au cours de processus inflammatoires chroniques aspécifiques, les cellules caliciformes épithéliales présentent des variations dans leur nombre et dans leur chromotropie. L'épithélium présente fréquemment des phénomènes de métaplasie, pouvant atteindre des degrés extrêmes de transformation en épithélium plat pluristratifié, accompagnée d'altérations nettes dans la distribution des substances mucopolysaccharidiques. En ce qui concerne les glandes, les modifications observées sont plutôt d'ordre numérique que d'ordre chromotropique.

CELLULES MUQUEUSES ET CELLULES MUCOÏDES DE L'ÉPITHÉLIUM GASTRIQUE DES OISEAUX

A. M. FANTIN

Istituto di Anatomia Comparata della Università
di Pavia e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

Dans le cadre des variations histochimiques de la sécrétion muqueuse, l'estomac présente une importance anatomo-comparative, en ce qu'il s'y distingue parfois des éléments muqueux et parfois des éléments mucoïdes (Bignardi).

Les connaissances acquises concernent les Mammifères, les Amphibiens et les Poissons.

Pour les Oiseaux, les conditions morphologiques et anatomo-microscopiques particulières des glandes de l'estomac glandulaire rendent la question plus complexe. L'étude des caractéristiques de plus ou moins grande acidité du mucus, outre qu'avec la réaction métachromatique (Zanotti et Camisani), peut maintenant être effectuée selon des techniques ultérieures telles que celle du bleu d'Alcian 8GN et telle que la réaction à l'hydrate ferrique colloidal. La réaction d'Hotchkiss permet des aspects plus fins que celle de Bauer et elle a été également utilisée avec les deux réactions d'acidité.

Ces multiples possibilités sont importantes car elles permettent parfois d'observer dans des cellules correspondantes du mucus d'acidité différente. L'étude de 22 espèces d'Oiseaux, conduite en tenant compte des cellules de l'épithélium superficiel, des fossettes, de l'épithélium du tubule collecteur, du paquet glandulaire et de la portion mucipare des tubules glandulaires, permet d'observer des tableaux qui varient d'une espèce à l'autre et d'un secteur à un autre.

On observe le plus souvent la presénce de cellules muqueuses typiques; on trouve aussi des éléments de transition et des éléments mucoïdes de même que chez les Mammifères et contrairement avec les données obtenues pour les Vertébrés inférieurs chez lesquels les éléments mucoïdes prédominent. La question n'est pas seulement importante au point de vue anatomo-comparatif mais a sûrement des répercussions fonctionnelles.

VERWENDUNG VON TETRAZONIUMSALZEN ZUM NACHWEIS VON SULFONSÄUREN

G. GEYER

Die durch Oxydation von Disulfidgruppen erzeugten Sulfonsäuren werden mit tetrazotiertem o-Dianisidin in essigsaurer Lösung zu Diazoniumsulfonaten umgesetzt. Eine nachfolgende Kupplungsreaktion mit alpha-Naphthol führt zur Anfärbung Sulfonsäure-haltiger Strukturen. Das Verfahren kann nach Oxydation mit Perameisensäure ausgeführt werden und vermeidet dabei die bei Schiffschem Reagenz oder Naphthoesäurehydrazid gleichzeitig erfolgende Darstellung von Aldehydgruppen. Frei Schwefelsäureester von sauren Mukoplysacchariden (Mastzellen, Knorpel, einige Schleimdrüsen, Becherzellen) lassen sich auf diese Weise ebenfalls darstellen.

Erfolgt die Umsetzung des Tetrazoniumsalzes in einer weniger stark angesäuerten oder in alkalischer Lösung, so werden auch die Zellkerne dargestellt. In diesem Befund wird eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Tetrazonium-Kupplungsreaktion (n. Danielli) nach Benzoylierung gesehen.

CELLULES MUQUEUSES ET MUCOÏDES DANS L'ÉPITHÉLIUM GASTRIQUE DES POISSONS

FRANCESCA BARBETTA

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

La distinction, sur des bases histochimiques, des cellules à sécrétion muqueuse et des cellules à secrétion mucoïde, d'après Bignardi, présente une importance considérable.

Parmi les aspects connus dans de nombreux organes, celui de l'estomac est particulièrement important. Nous possédons des données pour l'estomac de mammifères, d'amphibiens, d'oiseaux, et nous pouvons y ajouter celles qui suivent pour 24 espèces de poissons réparties entre les sélaciens, les chondrostéens et les téléostéens.

La distinction entre les deux types cellulaires qui, à l'origine, se basait sur la présence ou l'absencé de métachromasie, même après la chromisation, dans les cellules à sécrétion de Bauer positive, présentant les caractères morphologiques de cellules mucipares, s'effectue maintenant grâce à la coloration avec le bleu d'Alcian, à la seconde partie de la méthode de Hale, à la réaction de Hotchkiss et aux réactions contemporaines multiples de Hotchkiss-Alcian, Hotchkiss-Hale.

Le matériel qui se trouve dans les cellules mucipares de l'estomac des espèces de poissons étudiées, est toujours mucoïde, ce que confirment aussi les colorations au bleu d'Alcian et la réaction de Hale.

Ces résultats cadrent bien avec ceux que l'on obtient sur ses Amphibiens tandis qu'ils s'éloignent de façon notable de ceux que l'on observe à propos des mammifères et des oiseaux.

Malheureusement, nous ne pouvons pas compléter le tableau pour tous les vertébrés, faute de données sur les reptiles.

Il est toutefois important d'observer que dans les classes inférieures (animaux hétérothermes) on trouve toujours une sécrétion mucoïde et que dans les espèces supérieures (animaux homéothermes) la sécrétion peut être aussi muqueuse ou de transition.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE, CHROMATOGRAPHIQUE ET SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU MAXILON BLEU RL (GEIGY)

DARCY FONTOURA de ALMEIDA

Rio de Janeiro

Maxilon bleu RL est un produit technique développé par Geigy S.A. et utilisé pour colorer les fibres de polyacrylonitrile. Ce produit a été essayé comme colorant de coupes histologiques; en solution aqueuse à 0·05% il colore métachromatiquement les éléments contenant des mucopolysaccharides acides. L'analyse chromatographique du colorant montre que cette proprieté n'est pas due à des impurités. Une fraction bleue du colorant, isolée par elution dans l'eau distillée présente les propriétés spectrophotométriques et de coloration semblables à celles du colorant non purifié. La méthode suivante a été mise au point pour la coloration des tissus inclus dans la paraffine et fixés par formol-calcium: dégraisser dans le xylène et hydrater les coupes à l'alcool de concentrations décroissantes; colorer pendant 30 secondes à 1 minute dans la solution aqueuse à 0·05% de Maxilon bleu RL; laver dans l'eau distillée; déshydrater soit dans le butanol, 2 à 3 minutes, ou bien laver dans l'alcool à 70% et déshydrater à deux reprises pendant 2 minutes dans l'alcool absolu; passer au xylène et monter au DPX ou au baume du Canada. Les mucopolysaccharides acides sont colorés en rouge ou en violet; les autres éléments basophiles, en bleu. Le maximum d'absorption de la solution aqueuse diluée du colorant se trouve à 600 mu et le maximum de la fraction purifiée par chromatographie à 595 mu; les courbes sont tout à fait semblables. Avec l'addition de chromotropes (acide chondroitinesulfurique, héparine) ou de sels neutres (sulfate d'ammonium) il y a une déviation caractéristique du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde suivie d'une diminution dans la valeur absolue de ce maximum, ce qui s'observe plus nettement avec l'héparine. Sous ces mêmes conditions, le comportement de la fraction isolée par chromatographie est encore semblable au colorant non purifié.

On insiste sur le fait qu'on est en présence d'un mono-azo colorant qui présente quelques caractéristiques particulières aux colorants appartenant aux classes de l'oxazine et de la thiazine.

LIPID CARBONYLS AND PRODUCTS OF OXYDATION OF LIPIDS

M. WOLMAN

Department of Pathology Government Hospital Tel-Hashomer, Israel

Most lipid carbonyls in animal organs belong to the following three classes of compounds – a) the plasmalogens; b) the carbonyl containing steroids, and c) the products of oxidation of unsaturated lipids. Besides these three classes, carbonylic lipids occur as transitional stages of the beta oxidation of lipids, and these might contribute to the staining of tissues by the plasmal techniques.

Studies of the chemical structure of plasmalogens has shown that they are not acetal-phosphatides, but rather that the fatty aldehyde is bound in the enolic form by an ether link to the glycerol moiety. The chemical group which is responsible for the "carbonyl" reactions is the double bond near the ether link.

The various histochemical "carbonyl" procedures suggested for demonstrating ketosteroids stain the same structures as the plasmal and the direct-Schiff reactions although they differ in sensitivity. The intensity of staining of various tissues by all these reactions is increased whenever there is active lipid metabolism in them. This has been found in the liver, in fat tissue, in the breast, in kidneys and in the adrenals and genitals, during lipid mobilization, lipid deposition, or formation of lipid hormones. The increased stainability of the tissues probably indicates a higher degree of unsaturation which may be due to an increased number of double bonds, or to an increased reactivity of the double bonds, or else to both.

Unsaturated lipids may be oxidized *in vitro* in the process known as rancidity, during the histological preparation of sections, as well as *in vivo* by a similar process. During oxidation, epoxides, peroxides, carbonyls, 1–2 glycols and carboxyls are formed and the products have a strong tendency to polymerize. The process may be self perpetuating by displacement of the ethylenic links. The oxidative process can be enhanced by oxidation catalysts such as heavy metals, and inhibited by anti-oxidants, such as vitamin E. These data explain the conditions in which chromoli-

poids (also known as lipofuscins, ceroid, etc.) are formed *in vivo*. Chromolipoids may be deposited: a) physiologically in some organs with slow accumulation. This deposition was shown to be due to active metabolism, and the increased oxygenation which is the rule in active metabolic states is probably responsible for the formation of the lipid pigments; b) in tissue damage with or without hemorrhage, where the hemoglobin or other oxygen transport systems accelerate oxidation; c) in cases of poisoning by heavy metals, such as lead, bismuth, iron, thallium and copper, where the heavy metals serve as oxidation catalysts; d) in relative or absolute deficiency of anti-oxidants (mainly of vitamin E) in relation to the degree of unsaturation of the body fats. This occurs in experimental avitaminosis E, if the animals are fed a diet rich in unsaturated lipids, and in conditions associated with deficient absorption of this vitamin; e) from extraneous unsaturated fat introduced into the body, which is locally oxidized, as in some lipid pneumonias or in sites of lipid injections.

Different lipids may be oxidized and polymerized to form chromolipoids. The histochemical characteristics of the polymers differ, therefore, in accordance with the nature of the monomer, and also with the degree of polymerization. Most chromolipoids are sudanophilic, give a positive P.A.S. reaction because of the presence of 1–2 hydroxyls, are basophilic and acid fast because of the numerous carboxyls, and are fluorescent. The lower polymers are more soluble in lipid solvents, stain better by the performic (or peracetic) acid Schiff procedure and by the carbonyl and peroxide techniques than the higher polymers. Some chromolipoids are also stained by Feulgen's nucleal technique probably because of bound carbonyls.

In conclusion, the plasmal and the other carbonyl techniques stain mainly if not solely unsaturated lipids and their oxidative products.

LES LIPOPROTÉINES CELLULAIRES ET LEURS FONCTIONS ENZYMATIQUES

J. POLONOVSKI

Paris

Plusieurs voies s'ouvrent aujourd'hui pour l'étude des lipoprotéines cellulaires. La microscopie électronique nous révèle des structures biphasiques dans de nombreuses formations cytoplasmiques (mitochondries, membranes, parois cellulaires, etc.). Le fractionnement des constituants cellulaires par ultracentrifugations successives permet aussi de localiser les lipides et de connaître la distribution de leurs associations lipoprotéiniques. La difficulté de séparer ces lipoprotéines du matériel protéinique des structures cellulaires insolubles a été partiellement levée par les techniques de dissociations récemment mises en oeuvre: sonation, détergents, digitonine, solvants organiques etc. On a ainsi préparé des lipoprotéines cellulaires solubles dont certaines sont extrêmement riches en lipides.

Les lipoprotéines cellulaires pourront désormais être étudiées comme les autres lipoprotéines solubles antérieurement isolées (lipoprotéines plasmatiques, lipoprotéines de l'oeuf, lipoprotéines du lait).

L'importance des lipoprotéines dans le fonctionnement cellulaire résulte de multiples travaux. Les agents physiques ou chimiques qui dissocient ou détruisent les lipides semblent avoir pour premier effet de décomposer des édifices moléculaires dont les lipides étaient le ciment indispensable (voir les protéolipides cérébraux de Folch-Pi).

À côté de ce rôle purement physique des lipides, ils jouent un rôle spécifique dans de nombreux systèmes enzymatiques. On commence à connaître un certain nombre d'enzymes lipoprotéiniques dont la partie lipidique est indispensable à l'activité enzymatique (ATPase du muscle, hexokinase du cerveau etc.). Les travaux les plus importants (Green, Ziegler, Basford, Tisdale, Crane, Widmer, Hatefi, Lehninger, Stotz, Marinetti, etc.) ont porté sur les enzymes des chaînes respiratoires mitochondriales: succinoxydase et DPNHoxydase. Plusieurs enzymes sont très riches en lipides, telle la lipoprotéine Q qui porte l'ubiquinone et qui entre dans le système réduisant le cytochrome c_1 (96% de lipides, dont 45% de plasmalogène), la lipoprotéine c qui contient le cytochrome

c, et qui transfère les électrons du cytochrome c_1 au cytochrome a, le cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome a (riche en sphingomyéline), les lipoflavoprotéines (diaphorases), les lipoprotéines II et III de Green, l'une liée au cytochrome c_1 (86% de lipides), l'autre liée à la DPNH déshydrogénase (95% de lipides).

Les enzymes riches en lipides sont apparemment ceux dont la structure permet l'oxydoréduction énergétique ("phosphorylante"), c'est à dire le transfert de l'énergie d'oxydation dans une énergie de liaison.

Le mécanisme d'action des lipides peut être envisagé de plusieurs manières:

a) un rôle de membrane;

b) un rôle de phase solvante;

c) un rôle chimique spécifique.

A ce titre il convient de mentionner les travaux effectués sur l'incorporation dans les lipides des acides aminés marqués, des oses marqués, du phosphate marqué, qui révèlent un aspect particulièrement intéressant du rôle métabolique des lipides.

Les enzymes du métabolisme des lipides sont aussi probablement lipoprotéiniques, mais peu de résultats ont encore été obtenus dans ce domaine.

FURTHER STUDIES ON THE LIPID DISTRIBUTION IN THE TISSUES OF HIBERNATING TOADS

C. DEB, and M. MUKHERJI

Department of Physiology, University College of Science, Calcutta, India

Neutral lipids, unsaturated lipids, plasmalogen, cholesterol and phospholipid were demonstrated in the different tissues of toad *(Bufomelanostictus)* during hibernation (February), post-hibernation (April), breeding season (August) and pre-hibernation (November).

In liver and fat body, maximum sudanophilia had been observed during November which decreased during February and completely disappeared in April. From August it began to accumulate again. Unsaturated lipid, plasmalogen and cholesterol were absent in liver during February, some phospholipid only being present. The maximum value of all the four cytoplasmic inclusions were observed during August. The changes indicated that fat was being utilised during hibernation. In kidney and intestine maximum amount of unsaturated lipid, plasmalogen and phospholipid has been seen to occur during August and minimum during February; the cardiac muscle showed very little alteration in the lipid fractions. These changes have been ascribed to be due to seasonal alteration in the activity of the organ.

Adrenal gland of the toad also showed a seasonal variation in its activity. During hibernation maximum amount of all the different lipids have been observed in adrenals, which dropped to minimum value during non-hibernation. These findings indicated a hypofunction of the gland during hibernation. The effect of different stress conditions on adrenals was studied both during hibernation and non-hibernation. During non-hibernation a depletion of different lipid fractions in the stress condition indicated hyperfunction of this organ. Toads were also subjected to similar stress during hibernation when there was no alteration in the different lipids. The hibernating toads were also injected with 0·3 I.U. of adrenocorticotrophic hormone. A fall in the lipid fractions indicating increased adrenal cortical activity has been observed. These results showed that during hibernation there was a blockade in the release of adrenocorticotrophic hormone.

In both semineferous tubules and interstitial cell of testes maximum

accumulation of neutral lipid has been observed during hibernation. In the semineferous tubules maximum amount of unsaturated lipid and plasmalogen has been observed during August and minimum during February. The interstitial cells on the other hand contained highest amount of cholesterol and plasmalogen during February. The lipid fractions disappeared from the testes at this time on injection of pituitary gonadotrophin. During hibernation an impairment in the release of gonadotrophin might be postulated by these findings.

SUR LES CARACTÉRISTIQUES DE COLORABILITÉ DES LIPIDES "MASQUÉS"

L. HOLCZINGER

Onkopathologiai Kutató Intézet, Budapest

Il est généralement admis qu'on ne peut démontrer les lipides tissulaires "masqués" (lipoprotéines) au moyen d'une méthode de coloration qu'après leur libération ou démasquage à partir d'un composé albuminoïde.

Au cours de nos recherches nous avons extrait du tissu rénal des protéines solubles et des acides nucléiques à l'aide de chlorure de sodium de molarité variable. On pouvait constater que les lipides masqués des mitochondries deviennent colorables par cette simple méthode. Après l'extraction par le chlorure de sodium on remarque que les mitochondries ont une certaine activité enzymatique et qu'elles possèdent à côté des lipides aussi des albumines.

À la suite de ces examens nous en sommes arrivés à la conclusion que la partie lipidique des lipoprotéines des tissus peut être colorée, sous les conditions précises d'une méthode spécifique, sans qu'une séparation des albumines des lipides soit nécessaire.

CYTOPLASMIC GRANULES OF ASTROCYTES CULTIVATED IN VITRO

KAZUO OGAWA

Department of Anatomy, Kyoto University, School of Medicine, Kyoto, Japan

It has been reported by Ogawa and Okamoto (K. Ogawa and M. Okamoto: *Proc. 11th Ann. Meet. Am. Histochem. Soc., J. Histochem. Cytochem.*, in press, 1960) that cytoplasmic granules of cultured astrocytes are extractable lipids containing unsaturated bonds and cholesterols, rather than secreted mucopolysaccharides or mucoproteins as claimed by Lumsden (C. E. Lumsden: In: W. F. Windle (*ed.*), Biology of Neuroglia, pp. 141–161, Springfield, Ill., 1958).

This is to report that the living astrocytes may be classified morphologically into the following 3 major types:

Type I. Fusiform astrocytes

Type II. Astrophorous astrocytes

Subdivision a) Oligodendro-astrocytes

b) Standard astrocytes

c) Multidendro-astrocytes

Type III. Membraniform astrocytes.

Furthermore, cytoplasmic granules were observed in all types of astrocytes, although the amount of granules varies among the cell types. Fusiform astrocytes and oligodendro-astrocytes are considered to be ontogenically young astrocytes, and multidendro-astrocytes as well as membraniform astrocytes, the latter being characterized by a membrane attached to the processes, as rather older astrocytes. Standard astrocytes are characterized by having 5 to 6 moderately long processes with a moderate number of branches.

In addition, a lower activity of succinate-tetrazolium reductase, indicating a lower rate of oxidative respiration, associated with thinner and fewer mitochondria was observed in cytoplasmic areas with lipid granules as compared to areas without granules.

Further study on the metabolic role of lipid granules in astrocytes cultivated *in vitro* is in progress.

ELECTRON TRANSPORT ENZYMES: BIOCHEMICAL ASSAYS AND TETRAZOLIUM STAINING STUDIES

A. B. NOVIKOFF

Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York

The difficulties in localizing the intracellular sites of dehydrogenase activities by the tetrazolium technique will be indicated. Lactic dehydrogenase (LDH) will be used to illustrate the special problems of soluble dehydrogenases. The distribution of LDH activity among subcellular fractions isolated from rat liver and ascites tumor (Novikoff hepatoma) will be compared with the distributions of lactate-tetrazolium reductase, DPNH-tetrazolium reductase, DPNH-dichlorophenolindophenol reductase, and DPNH-cytochrome c reductase activities. It will be suggested that the term "diaphorase" be abandoned in cytochemistry.

The advantages will be outlined of using formal-calcium-fixed tissues and reduced coenzymes (DPNH and TPNH) as substrates in the tetrazolium procedure. The results obtained with this technique in a wide variety of tissues will be presented to indicate: (1) that neither DPNH nor TPNH can be used in the tetrazolium procedure to stain either mitochondria or "microsomes" generally; and (2) that the tetrazolium technique may be of great value in indicating cells in which TPN-linked metabolic sequences may be of special significance, such as in a variety of endocrine tissues (adrenal, pancreas, pituitary, thyroid) and in the macula densa, thin limbs of Henle's loops, and collecting ducts in the papilla (rat kidney).

ÉTUDES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME STÉROÏDE-3β-ol DÉSHYDROGÉNASE DES ORGANES REPRODUCTIFS DE LA RATE*

HELEN WENDLER DEANE, BERTHA L. LOBEL,
ELLEN C. DRIKS et BETTY L. RUBIN

Albert Einstein College of Medicine, New York 61, N.Y. U.S.A.

L'activité enzymatique d'une déshydrogénase qui transforme les Δ^5-3β-hydroxystéroïdes en Δ^4-3-cétostéroïdes est démontrable dans un milieu d'incubation contenant de la dehydroépiandrostérone (DHA), du nucléotide diphosphopyridine et du "Nitro-Bleu Tetrazolium" (Levy *et al.*, *Endocrinology* 1959, 65: 932).

Cet enzyme n'était présent prouvé que dans les cellules thécales, intersticielles, et lutéales et dans les cellules granuleuses des follicles atrésiques de l'ovaire. Dans ces cellules, aucune fluctuation de l'activité enzymatique ne fut visible durant différentes périodes du cycle ovarien, soit durant la grossesse ou la lactation. Les cellules thécales et intersticielles étaient actives dans l'état prépubéral. Nous pouvons conclure que le degré de l'activité n'est pas sous la dépendence du niveau des gonadotrophines circulantes.

Ce ferment a maintenant été démontré dans quelques cellules trophoblastiques du placenta de la rate. L'activité enzymatique était bien démontrable du 8e jour au 15e jour de grossesse. Toutefois, au 18e jour elle était devenue plus basse. Au 21e jour, aucune activité n'était visible. Une mesure biochimique de l'activité enzymatique indiquait une oxydation modérée du DHA au 12e jour, mais aucune au 21e jour. Cette activité réduite peut être reliée aux observations de la fonction endocrinienne du placenta de la rate (Courrier et Cologne).

---

*Ce travail fut aidé par dons de U.S.P.H.S. (A-3605, A-2795 et HTS-5408).

HISTOCHEMICAL ENZYME TECHNICS APPLIED TO STARCH GEL ELECTROPHORESIS

P. J. MELNICK and S.-H. LAWRENCE

From the Clinical Laboratory Service and Biochemistry Research Laboratory, Veterans Administration Hospital, San Fernando, California, U.S.A.; and the Departments of Pathology and Infectious Diseases, University of California, Los Angeles, California, U.S.A.

1. Adaptation of histochemical technics for use in starch gel electrophoresis are reported for 11 enzymes: aminopeptidase, beta-glucuronidase, cytochrome oxidase, cholinesterase, esterase, acid and alkaline phosphatases, and succinic, lactic, beta-hydroxybutyric and glutamic dehydrogenases.

2. The 11 enzymes were studied in this medium in human serum, the serum of 6 other mammalian species (monkey, dog, rabbit, guinea-pig, rat and mouse), 6 normal human tissues (heart, liver, kidney, spleen, adrenal and brain), and several human malignant tumors (5 cases of carcinoma of the breast, and 1 each of carcinoma of the prostate, parotid mixed tumor, and reticulum cell sarcoma).

3. Representative enzyme patterns in the above material are illustrated (Figs. 1, 2 and 3). The significance of some of the enzyme patterns is discussed, especially their relation to enzyme inhibitors, and to hormone dependence and metabolic cycles of tumors.

ÉTUDES HISTOCHIMIQUES DES ACTIVITÉS SUCCINOOXYDASIQUE ET SUCCINODÉSHYDROGÉNASIQUE

C. TORDET-CARIDROIT et R. WEGMANN

Institut d'Histochimie Médicale, Faculté de Médecine, Paris

La mise en évidence histochimique de ces systèmes réducteurs repose sur les propriétés des sels de tétrazolium; ces sels par réduction, précipitent en cristaux colorés appelés formazans; l'observation au microscope de ces formazans permet d'apprécier l'activité enzymatique de la coupe.

Pour différencier et contrôler les activités succinooxydasique et succinodéshydrogénasique, nous employons un jeu de six milieux incubateurs:

Milieux	I	II	III	IV	V	VI
Néotétrazolium	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Tampon phosphate	3 ml	2 ml	1 ml	1 ml	2 ml	1 ml
KCN	0	0	0	1 ml	1 ml	1 ml
Succinate	0	1 ml	1 ml	1 ml	0	1 ml
Malonate	0	0	1 ml	0	0	1 ml

Le milieu I sans substrat spécifique indique le pouvoir réducteur endogène de la préparation. Le milieu II donne l'activité succinooxydasique. Le milieu III inhibe une partie de cette dernière activité. Le milieu IV par la présence du cyanure supprime la chaîne cytochromique et indique l'activité succinodéshydrogénasique. Le milieu V contrôle la solution de cyanure. Le milieu VI inhibe entièrement l'activité succinodéshydrogénasique.

La concordance histochimique et biochimique est discutée.

Les différentes méthodes (digestion par la lipase et la trypsine, variations de *pH* et de température, interposition d'autres accepteurs comme la phénazine méthosulfate) permettant de décomposer le complexe enzymatique en ces différents constituants sont exposées et leurs résultats discutés.

Nous avons étudié ces systèmes sur le coeur, le rein, le foie, l'estomac et le cerveau du rat normal et du rat anoxique.

AKTIVITÄT DES DEHYDROGENASE-SYSTEMS IM VERLAUFE DER SPERMIOGENESE

Z. PÓSALAKY, I. TÖRŐ, A. GYÉVAI

Institut für Experimentelle Medizin der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Morphologische Abteilung, Budapest

Die Veränderungen der Aktivität der Succin-Dehydrogenase wurde im Verlaufe der Spermiogenese der Ratten auf Kryostat-Schnitten untersucht. Die jungen Spermiocyten zeigen während ihres Wachstums und ihrer frühen Profase eine starke Reaktion. Die Reaktionstärke vermindert sich in der späten Profase und ist ganz niedrig im weiteren Verlaufe der zwei meiotischen Teilungen. Die Spermiden zeigen nach ihrer Ausbildung eine Reaktion zunehmender Stärke, die sich während ihrer Umwandlung in Spermien fortlaufend steigert. Im Mittelstück der sich ausgebildeten Spermien kommt noch vor ihrer in das Lumen erfolgte Spaltung eine positive Reaktion zustande.

Die rohe, ungleiche Erscheinungsform der Reaktion – besonders in den jungen Spermiocyten und im jetzten Abschnitt der Spermiden-Umwandlung – wirft auch hier die Frage der Lipoidlösung auf. Nach verwendung von Enzyminhibitoren bekamen wir aber sowohl an den erwähnten Stellen, als auch an den anderen Stellen des Schnittes eine negative Reaktion.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlauf der Spermiogenese von einer sich abwächselden Aktivität des Szent-Györgyi-Krebs-Zyklus begleitet wird.

A HISTOCHEMICAL STUDY OF OXIDATIVE ENZYMES IN MYELINATING CULTURES OF CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS TISSUE*

T. YONEZAWA, M. B. BORNSTEIN, E. R. PETERSON
and M. R. MURRAY

Laboratory for Cell Physiology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York

Exceptionally high oxygen consumption and glucose utilization characterize central nervous tissue. These functions appear to be linked metabolically. Organized tissue cultures of the mammalian nervous system require an elevated glucose ration for maintenance, and especially for the development of myelin. Optimal myelin formation in cultures of new born rat cerebellum occurs at a glucose level of 500-600 mg per cent.

An attempt has been made here to examine more specifically the glucose utilization by various cell types present in central and peripheral nervous tissues (cerebellum and spinal ganglia) before, during and after myelinization *in vitro*. Thus the pattern and time sequence in reactivity of succinic dehydrogenase, DPN and TPN diaphorases were demonstrated by incubating the cultures in solutions of their respective substrates in the presence of blue nitrotetrazolium as an electron acceptor.

During the whole course of cultivation Purkinje cells and neurons from the dentate nucleus show high activity of all three enzymes. Granule cells are low in activity; localization corresponding in distribution with their sparse mitochondria.

Two types of macroglia show different patterns. In astrocytes, reaction granules are diffusely distributed throughout the perikarya and processes from the beginning of cultivation. In oligodendroglia, however, the pattern changes significantly. At 7 days these cells react only in the peri- and juxtanuclear area; but at 13-17 days, coincident with the appearance of myelin, reaction granules are always dispersed throughout the processes

*Supported by National Multiple Sclerosis Society and U .S. Public Health Service Grant B-858.

and are found aligned along myelinating axons. In older cultures, in which myelinization is less active, this enzymatic activity subsides.

Neurons of dorsal-root ganglia are low in succinic dehydrogenase and DPN diaphorase activity during the first week, but a great increase occurs during the second week, and maximal reactions occur at the time of myelin formation. In capsule and Schwann cells, perinuclear DPN diaphorase is found in the early stage of development, succinic dehydrogenase and TPN diaphorase becoming active only in the second week. A remarkable increase of activity in Schwann cells occurs just before myelin appearance; the enzymes are then found throughout the elongated cytoplasmic envelope. Activity subsides as myelination becomes completed.

CYSTÉINE DÉSULFHYDRASE DU SAC VITELLIN DES OISEAUX, SA DÉTECTION HISTOENZYMOLOGIQUE

F. CHAPEVILLE et L. KHAU VAN KIEN

Service de biologie — commissariat à l'énergie atomique
Gif sur Yvette — France

La synthèse de la taurine à partir du sulfate minéral dans l'oeuf embryonné d'Oiseaux correspond aux réactions suivantes:

1) Réduction du sulfate en sulfite,

2) Fixation du sulfite sur la chaîne carbonée provenant de la désulfhydration de la L-cystéine avec formation de l'acide L-cystéique.

3) Décarboxylation de l'acide cystéique en taurine.

La réaction (1) a lieu exclusivement dans les cellules de l'endoderme du sac vitellin.

L'enzyme (cystéine désulfhydrase) qui catalyse la réaction (2) apparait d'abord dans ces cellules puis dans le vitellus.

La réaction (3) est générale; localisée dans le sac vitellin et dans l'embryon.

Dans ce travail, nous avons étudié la mise en évidence de la L-cystéine désulfhydrase (Réaction II) et sa localisation dans les cellules du sac vitellin par la méthode histoenzymologique. En présence d'un sel de plomb l'activité enzymatique est détectée par le sulfure formé in situ à partir de l'hydrogène sulfuré libéré de la cystéine.

Les images obtenues sont histologiques et mêmes cellulaires, l'enzyme est localisé dans le cytoplasme des cellules de l'endoderme du sac vitellin et de ses villosités exclusivement.

Absent au niveau des vacuoles, l'enzyme occupe à l'intérieur des cellules des positions variables avec le stade de l'activité cellulaire.

THE USE OF CYTOCHEMICAL TOOLS FOR STUDY OF OXIDATIVE ENZYMATIC ACTIVITY IN CELLS OF VAGINAL SMEAR PREPARATIONS*

C. G. ROSA

The Daniel Baugh Institute of Anatomy, Jefferson Medical College,
Philadelphia 7, Pennsylvania

Earlier observations have indicated that diphosphopyridine nucleotide--diaphorase is cytochemically demonstrable within certain cells found in the vaginal pool of the mouse during proestrus. The method employed involves the use of lactate, coenzyme I and nitro-BT and has recently been applied to human smear preparations obtained during the menstrual cycle and postmenopausal states. Exfoliated cells derived from pathologic lesions such as squamous cell carcinoma of the uterine cervix have also been studied.

Data acquired up to the present time indicate that various normal components can contain high enzymatic activity. These are the endometrial cells, histiocytes and certain leucocytes. Cells demonstrating somewhat lesser activity are those derived from the basal layers of the vaginal epithelium. Progressive cornification of these cells leads to the loss of demonstrable enzyme. Malignant cells and many of the microbial flora of normal and pathologic states show considerable activity.

The relative ease and brevity of the technical manipulations should allow for the continued application of cytochemical oxidative enzyme procedures to simple smear preparations. This report emphasizes especially, the consideration of materials for study which derive cellular components by virtue of exfoliative mechanisms.

---

*Supported in part by research grant (RG-6008 C1) from the Division of Research Grants, National Institutes of Health, Bethesda 14, Maryland.

INTRACELLULAR LOCALIZATION OF SUCCINIC DEHYDROGENASE AND DPN-DIAPHORASE AS REVEALED BY ELECTRON MICROSCOPY

D. G. SCARPELLI

Department of Pathology, Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

One millimeter cubes of cortical tissue from rat kidney were incubated in media containing Tris buffer (*pH* 7·4), 0·44 M sucrose or 7,5 per cent polyvinyl-pyrrolidone, 0·5 mg Nitro BT, 1×10^{-2} M KCN and either 1×10^{-2} M of sodium succinate or reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) as substrates. Cortical tissue incubated in identical media devoid of substrate served as controls. Duplicate experiments were performed in which cell membranes were damaged by freezing and thawing. Amytal was used as a respiratory inhibitor in several experiments in an effort to differentiate between intra- and extra-mitochondrial DPN-diaphorase.

Electron dense deposits intimately associated with intramitochondrial membranes were visualized when sodium succinate was used as the substrate. Incubation in DPNH-containing media, on the other hand, resulted in the visualization of electron dense formazan deposits on the extra-mitochondrial membranous and granular elements of the cytoplasm and the outer mitochondrial membrane.

A HISTOCHEMICAL STUDY OF OXIDATIVE ENZYMES IN SKELETAL TISSUES

D. G. WALKER

Developing bones have been assayed histochemically for oxidative enzymes by a modification of the NO_2BT method. An attempt will be made to relate the histochemical findings to basic problems in the histogenesis of bone.

AZO-DYE AND NAPHTHOLIC FLUORESCENCE TECHNIQUES FOR THE DEMONSTRATION OF PHOSPHATASES

M. S. BURSTONE

National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Public Health Service, Department of Health, Education, and Welfare, Maryland, U.S.A.

Theoretical considerations as well as practical experience indicate that some form of tissue fixation is usually necessary for the accurate localization of phosphatases. Frozen-dried, single and double embedded tissues yield highly reproducible results for the demonstration of both acid and alkaline phosphatases. Frozen sections mounted on glass slides (Adamstone-Taylor cold knife method) also give useful results provided that they are briefly fixed in diacetone alcohol or acetone.

With reference to simultaneous coupling procedure, naphthol AS-phosphates appear to be the best general purpose substrates. These compounds are rapidly hydrolyzed and couple over a wide *pH* range with suitable diazonium salts to form highly insoluble, permanent azo-dyes. The introduction of halogen groupings into these substrates facilitates their use with frozen sections, in that the azo-dye formed is less lipid soluble than that produced from simpler naphthols.

The new post-coupling procedures are of interest from several standpoints. First, the localizations obtained with them agree with those obtained with the use of other techniques. Second, certain structural features of the naphthol molecule may be employed in the design of substrates for the demonstration of other hydrolytic enzymes. The naphtholic fluorescence techniques represent an innovation in phosphatase procedures, in that the released products require no coupling. The method is potentially very sensitive because of the highly fluorescent nature of the enzymatically released product, and may find application in the "*in vivo*" study of phosphatase activity.

The possible design of naphtholic substrates for specific types of phosphatases is also considered.

In addition to facilitating more definitive microscopic localizations, the newer naphtholic substrates shed light upon the nature of substantivity

from the histochemical standpoint. Implicit in consideration of substrate design should be molecular geometry as well as the presence of certain structural features. Among these the presence of peptide bonds, saturated ring structures, halogen, azo, and quinone groupings have been shown to enhance substantivity. The value of the aforementioned groups is evident in the case of the post-coupling and fluorescent substrates.

HISTOCHIMIE DES ATP'ASES

Z. BANKOWSKI, A. VORBRODT

I. L'ATP et son rôle dans les tissus vivants.
   1. Le donneur essentiel d'énergie.
   2. Les précurseurs des polynucléotides.
   3. L'activité ATP'asique des tissus.

II. Les méthodes de détection de l'activité ATP'asique.
   1. Méthodes biochimiques (quantitatives)
      – libération de phosphore.
      – luminescence.
   2. Méthodes histochimiques (qualitatives).

III. Les facteurs qui influent sur les méthodes histochimiques.
   1. Fixation.
   2. Pénétration de l'ATP par les membranes cellulaires et intracellulaires.
   3. Hydrolyse de l'ATP.
   4. *pH* du milieu d'incubation.
   5. Temps d'incubation.
   6. Concentration d'ATP, des sels de Ca, Pb et Mg.
   7. Protection osmotique.

IV. La spécificité de la réaction.
   1. La spécificité du substrat AMP,ADP,GP.
   2. Les inhibiteurs.
   3. Optimum du *pH*.
   4. Hydrolyse non enzymatique.

V. La valeur des méthodes histochimiques.

VI. Confrontation des résultats obtenus avec les méthodes biochimiques et histochimiques.

VII. L'activité ATP'asique des noyaux cellulaires.

VIII. Les opinions sur la spécificité des ATP'ases et leur rôle dans le métabolisme intracellulaire.

IX. Les conclusions.

L'EFFET DE LA DISTENSION DE LA VESSIE SUR L'ÉPITHÉLIUM DE LA PAROI ET SUR SA RÉACTION HISTOCHIMIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

B. F. MARTIN

de l'Université de Sheffield, Angleterre

Une étude fut faite sur des cobayes (principalement des femelles) après distension – aiguë et chronique – de la vessie. La distension aiguë fut provoquée par l'injection d'eau saline dans la vessie au moyen d'un cathéter de verre; la distension chronique, par la ligature du col de la vessie pendant des périodes allant jusqu'à 24 heures. Les vessies en état de distension furent fixées dans alcool 80%. L'objet de cette étude fut de déterminer l'effet mécanique de la distension sur l'épithélium de la paroi, ainsi que son effet sur la réaction des phosphatases alcalines, mais aussi pour déceler si la distension stimulerait cet épithélium à effectuer des divisions cellulaires.

Après distension, les couches de cellules de l'épithélium se trouvent réduites en nombre, de cinq à deux ou trois, et les cellules sont allongées parallèlement à la surface. La réaction de la phosphatase alcaline, qui se trouve dans le chorion et dans le cytoplasme apical des cellules de l'épithélium, est fortement réduite après la distension, aiguë comme chronique, et redevient normale si la vessie est vidée. Nous observons quelques modifications du mouvement de la cellule pendant la distension.

Après la distension chronique, nombre de sujets présentent dans l'épithélium des mitoses, même après une période aussi courte que six heures de distension.

NUCLEOLAR CHANGES IN RELATION TO ATP

M. YOSHIDA and C. M. POMERAT

Tissue Culture Laboratory, University of Texas Medical Branch, Galveston, and the Pasadena Foundation for Medical Research, Pasadena, California

The effects of nucleosides and nucleotides on the cell have been reported mainly with reference to their action on mitosis and growth. The literature describing their inhibitory effects has been reviewed by Brachet (1957). However, adenosine and yeast adenylic acid were demonstrated to be ineffective in the production of mitotic aberration (Biesele *et al.* 1952). Adenosine was also proven to cause changes in the shape of the nucleoli of chick osteoblasts (Hughes, 1952). There is little data on the effect of adenosine triphosphate (ATP) on the living, intact cell. These studies show that ATP from an external source cause (1) cytoplasmic rigidity (Runnström and Kriszal, 1950), (2) reversal of the effect of colchicine on mitosis (Lettré, 1950), and, (3) changes in the viscosity of protoplasm (Zimmerman *et al.* 1958).

Notable alterations in the structure and function of cells in culture followed treatment with 1·8 mg/ml of ATP and adenosine monophosphate (AMP) at 18 mg/ml for two hours. Upon their return to nutrient media, the following changes were observed in the nucleoli: (1) decrease in their number, (2) change to a spherical form with a higher optical density, (3) central vacuolation of rounded forms, (4) in addition to the formation of fine, dense granules and amoeboid masses in the cytoplasm. Similar results were obtained when AMP was substituted for ATP; however, the concentration required was about ten times greater. These observations were made with time-lapse cinematography.

Sodium phosphate was toxic to the cells at the same concentration as the ATP. It was of interest that cells with a single, dense nucleolar form showed continued mitotic activity and that very small multiple nucleoli were formed in the daughter cells. In untreated controls, irregularly shaped nucleoli with indistinct margins showed the presence of both desoxy and ribose nucleic acids. However, loss of DNA in the rounded nucleoli following ATP was shown with the use of the Feulgen reaction as well as with pyronin-methyl green and gallocyanine staining. There appeared to be no gross change in RNA. The aggregation of DNA was confined to the margin of the nucleoli. These results may prove useful in the study of nucleolar organizers.

L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ACIDE DANS LES LYSOSOMES HÉPATIQUES: LA DÉMONSTRATION, PAR LE MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE, DE SON PRODUIT DE RÉACTION

E. ESSNER and A. B. NOVIKOFF

Albert Einstein College of Medicine, New York

La localisation intracellulaire du produit de réaction de la phosphatase acide dans le foie mammifère a été étudiée sur des sections fines au microscope électronique. Le matériel comprend des foies de rats non traités, des rats perfusés par de la bilirubine, et du foie humain riche en granules de lipofuscines.

Les cellules de Küpffer de foie de rat et de foie humain contiennent de larges lysosomes (Novikoff and Essner, *Am. J. Med.*, July 1960). Au microscope électronique, ces particules montrent de gros dépôts du produit de la réaction enzymatique.

Dans les cellules parenchymateuses du foie de rat, les gros dépôts du produit de la réaction enzymatique sont restreints aux particules péricanaliculaires cytoplasmiques. D'après leur grandeur, leur quantité et leur localisation, ils correspondent aux corps denses, péricanaliculaires. Ceci renforce nos points de vue proposés récemment (Novikoff *et al.*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, *2: suppl.*, 179, 1956; de Duve, p.128, in "Subcellular Particles," T. Hayashi, *ed.*, 1959) que les corps denses péricanaliculaires sont les lysosomes des cellules parenchymatiques du foie.

L'injection de bilirubine est marquée par l'apparition de nombreux microcorps dans les cellules parenchymateuses. Ils montrent une activité de la phosphatase acide et devraient être inclus dans la classe, large à présent, des particules cytoplasmiques, les lysosomes. Les mécanismes selon lesquels l'entrée de la bilirubine se produit dans les microcorps sont inconnus. Il est possible que les microcorps soient des stades avancés dans la "maturation" des vacuoles de pinocytose qui transportent la bilirubine. Quoique les transitions apparentes entre les corps denses péricanaliculaires et les microcorps ne furent pas vus, la transformation directe et rapide de l'un à l'autre reste possible.

Dans le foie humain, l'attention a été attirée sur les granules de lipofuscines qui, d'après de récentes études (Essner and Novikoff, *J. Ultrastructure Res.*, in press; Ehrlich *et al.*, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, in press), semblent être des lysosomes altérés. Le produit de réaction enzymatique est restreint aux régions périphériques et relativement non altérées des corps denses péricanaliculaires originaux.

L'étude démontre l'emplacement du produit de réaction de la phosphatase acide dans le foie et met l'accent sur les modifications dans les lysosomes, et dans la physiologie et la pathologie de ces cellules.

HISTOLOGICAL AND PHYSIOCHEMICAL PARALLELS IN MICE FOLLOWING HETEROLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION

G. C. ROYAL, JR.

Department of Biology and Gladys W. Royal, Department of Chemistry,
The Agricultural and Technical College of North Carolina

Alkaline phosphatase, an enzyme specifically present in rat bone marrow cells, can serve as an index to differentiate between injections and successful transplants of rat bone marrow in mice. Normal $(B \times D)F_1$ females, after exposure to 900r and protective amounts of rat bone marrow were sacrificed. Histological studies of blood and spleen were made. Seven organs, liver, lung, spleen, kidney and brain were measured for tissue weight and serotonin level. Lymph nodes and spleens were further tested for hemagglutination with rat globulin. Ultra-violet and electrophoretic patterns of sera were obtained. Initial reduction in serotonin level; positive hemagglutination; increased subcutaneous response to vasoconstricting agents; alteration in ultraviolet absorption and electrophoretic patterns are among the findings that parallel the positive alkaline phosphatase tests.

This work has been supported by U. S. Atomic Energy Commission Contract No. AT (40 – 1) 2399.

VARIATIONS DE LA PHOSPHATASE ALCALINE RÉNALE EN RAPPORT AVEC LE MÉTABOLISME PHOSPHOCALCIQUE

G. RUCART et C. PAYEUR-VILLENEUVE
Département d'Anatomie, Université Laval, Québec

Par la méthode histochimique de Gomori, modifiée par Verne et Hebert, nous avons étudié le comportement de la phosphatase alcaline rénale au cours de certaines perturbations du métabolisme phosphocalcique chez le Lapin et le Rat.

L'injection répétée de phosphate disodique au Lapin provoque une très forte diminution de l'activité phosphatasique dans la première partie du segment proximal du néphron, l'activité restant normale, sinon augmentée, dans sa deuxième partie.

Chez des Rats soumis à un régime dépourvu de calcium et enrichi en phosphore, il se produit une néphrocalcinose avec hydronéphrose et l'activité phosphatasique disparaît presque totalement (cf. Erankö et Niemi, *Act. Path. Micr. Scand.* 35, 357, 1954). En l'absence d'hydronéphrose, l'activité reste normale, sinon augmentée, la phosphaturie étant égale dans les deux cas.

Ces résultats nous ont conduit à reprendre pour la développer, l'étude effectuée chez le Rat par Eger et Geller (*Virchow's Arch.* 218, 222, 1953) de l'influence parathyroïdienne sur la phosphatase alcaline rénale.

La parathyroïdectomie détermine une diminution élective de l'activité phosphatasique dans le partie droite du segment proximal. Cette diminution n'existe pas chez les animaux non tétaniques après l'opération et ne se retrouve pas non plus après injection de parathormone (Para-Thor-Mone Lilly) à l'animal thyroparathyréoprive tétanique.

Chez l'animal normal, une dose unique de parathormone (100 unités U.S.P.) ne provoque pas de modification appréciable (cf. Kochakian *et coll., Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 82,495, 1953). Mais répartie en deux injections à un jour d'intervalle, elle détermine une augmentation de l'activité phosphatasique surtout marquée au niveau de la partie droite du segment proximal.

En conclusion, le comportement de la phosphatase alcaline rénale diffère donc dans les portions initiale et distale du segment proximal. L'action parathyroïdienne chez le Rat paraît s'exercer essentiellement sur cette dernière portion, l'effet inhibiteur des ions phosphates s'observe surtout sur la portion initiale.

Recherche subventionnée en partie par le C.N.R. du Canada.

ÉTUDES SUR L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PHOSPHATASES SPÉCIFIQUES

T. BARKA

The Mount Sinai Hospital, New York

L'hétérogénéité des phosphatases spécifiques du foie est indiquée par de nombreux travaux chimiques. Cela impose à l'histochimiste le devoir de distinguer et de localiser les membres divers de ce groupe d'enzymes spécifiques, tels que l'ATPase, la 5-nucléotidase, la phosphatase acide etc. Mais les limitations des techniques actuelles doivent d'abord être nettement définies.

Le problème peut être exploré de plusieurs manières: 1. Isolement des enzymes spécifiques, surtout par les méthodes électrophorétiques. 2. Corrélation des effets d'inhibiteurs et d'activateurs sur les colorations histochimiques et sur les enzymes purifiées. 3. Investigation de l'effet de la technique histochimique sur les enzymes spécifiques. 4. Méthodes immunocytochimiques (localisation, inhibition spécifique et immuno-fixation). 5. Étude de la distribution des phosphatases spécifiques dans les foies modifiés par des méthodes experimentales.

Certains de ces moyens d'attaque ont été appliqués à l'étude de la phosphatase acide. Les résultats indiquent: 1. La présence d'au moins deux phosphatases acides dans le foie de rat. 2. Une localisation artificielle, dependant principalement de la discrimination sélective d'une des phosphatases acides par la fixation au formol et 3. L'excrétion sélective d'une des phosphatases acides dans la bile.

Des études histochimiques similaires semblent indiquer qu'il y a au moins trois ATPases et deux 5-nucléotidases. Ces résultats seront discutés du point de vue de l'histochimie.

RECHERCHES HISTOCHIMIQUES SUR LES SURRÉNALES ET LES REINS DE COBAYES

R. HOLLANDER

Department of Anatomy, Emory University, Atlanta 22, Ga., U.S.A.

Ces recherches ont été réalisées sur les surrénales et les reins de Cobayes normaux et scorbutiques en utilisant comme substrat pour l'action des phosphatases les esters-phosphates suivants: diphosphopyridine nucléotide (DPN), adénosine-5-monophosphate (AMP), adenosine tri--phosphate (ATP), sodium β-glycérophosphate, glucose-6-phosphate, uridine triphosphate, pyridoxal phosphate, riboflavine-5-phosphate, triphosphopyridine nucléotide (TPN), et thiamine pyrophosphate et en employant la technique de Gomori.

Les fixations ont été faites à l'alcool à 80°. Les témoins ont consisté en individus normaux soumis ou non à la même nutrition que les individus scorbutiques.

Les modifications de la distribution de l'activité des enzymes seront analysées.

QUELQUES OBSERVATIONS HISTOCHIMIQUES SUR LE TISSU AORTIQUE HUMAIN À L'ATHÉROSCLÉROSE

M. SANDLER

Département d'Anatomie, Emory Université, Atlanta 22,
Géorgie, É.–U.

On a fait des études histochimiques des enzymes qui déphosphorylent l'adénosine triphosphate (ATP), l'adénosine monophosphate (5-nucléotidase ou AMP), la diphosphopyridine nucléotide (DPN), la triphosphopyridine nucléotide (TPN), les glucose-1- et glucose-6-phosphates, en se servant d'une technique du type de Gomori pour les phosphatases. On a fait ces expériences avec des morceaux d'aorte humaine prélevés d'une minute à cinq heures après la mort.

Cette recherche compare l'activité et la distribution de ces enzymes dans les parois et dans les parties endommagées par l'athérosclérose de ces aortes avec différentes aortes jeunes et vieilles.

Il en ressort une diminution nette de l'activité de l'ATP-ase et de la 5-nucléotidase dans les zones athéromateuses mais aucun changement de l'activité de la DPN-ase et surtout une augmentation de l'activité de la TPN-ase de l'aorte atérosclérotique.

On parlera de la parenté possible des activités avec le développement d'athérome.

L'HISTOCHIMIE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE HÉRÉDITAIRE AUX SOURIS ET DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE AUX RATS AVEC UNE DÉFICIENCE DE VITAMINE E

NELLY GOLARZ

Department of Anatomy, Emory University, Atlanta 22, Ga., U.S.A.

Les études sur la dystrophie musculaire humaine ont démontré que l'endomysium en prolifération développe une forte activité déphosphorilante pour les esters phosphates de haute énergie et avec pour coenzymes tels que le DPN et le TPN.

L'application de ces mêmes techniques aux muscles de souris souffrant de dystrophie musculaire héréditaire démontre que le tissu conjonctif en prolifération n'a pas ces propriétés.

Chez les rats en déficience de vitamine E se voient, dans le tissu conjonctif quelques réactions qui sont similaires à celles de la dystrophie humaine mais elles ne sont pas si intenses.

Ces résultats suggèrent que du point de vue histochimique, la dystrophie chez la souris est différente que chez l'homme et que la dystrophie causée par le manque de vitamine E, bien que pareille à la maladie humaine, n'est pas identique.

PHÉNOLS ET INDOLS ET LE SYSTÈME ENTÉROCHROMAFFINE

M. VIALLI

Pavia

HISTOCHIMIE DES CATÉCHOLAMINES DANS LA MÉDULLO-SURRÉNALE

G. VITRY

Parmi les techniques de mise en évidence des catécholamines, la réaction phéochrome, classique (par fixation au Regaud ou au Helly) ou modifiée (réactions à l'iodate et au bichromate-chromate de Hillarp et Hökfelt), présente une grande spécificité pour les catécholamines. La localisation de celles-ci, sur coupes, est aisée grâce à la formation de pigment de type mélanine, par polymérisation sous l'effet de l'oxydation ménagée de la réaction.

L'aspect même de la réaction phéochrome et ses possibilités de déceler le maximum de catécholamines ou de distinguer électivement l'une ou l'autre de ces amines, sont étroitement liés aux conditions de son obtention. Le *pH* de la solution et surtout le maintien du support lipoprotéique des catécholamines jouent en effet un rôle très important. Dans le cas où l'agent oxydant pourra amener la formation *immédiate* de pigment polymérisé, la réaction sera positive; dans les autres cas, le maintien du support *conditionnera* le maintien des catécholamines. La mise en évidence de celles-ci dépendra alors de leur conservation plus ou moins intégrale, et de leur réactivité; en effet, les agents utilisés pour le maintien du support peuvent modifier soit ce support lui-même, soit les amines pressives, soit leur mode de liaison réciproque.

Il convient d'insister sur le fait que, dans la médullo-surrénale, une partie des catécholamines est peu ou pas liée. Cette fraction, vraisemblablement celle qui varie dans les réponses *physiologiques* de la glande, n'est peut être pas decelée histochimiquement; de sorte que la réaction phéochrome, en l'état actuel des techniques utilisées, ne paraît montrer de modifications vraiment significatives que dans des cas exceptionnels, d'ordre pathologique ou expérimental.

REFLECTIONS ON THE NATURE OF THE ENTEROCHROMAFFIN SUBSTANCE

R. D. LILLIE

Department of Pathology, Louisiana State University School of Medicine, New Orleans, Louisiana (12) E. U. A.

Summarizing, a catechol structure seems more indicated than a hydroquinone structure. Any aminophenol structure, primary or secondary seems contra-indicated. The resorcinol hypothesis seems untenable. Serotonin is chemically and sometimes histochemically demonstrable in carcinoid tumors, but its presence in normal enterochromaffin cells in demonstrable amounts seems contra-indicated. The azo positive phenol in the enterochromaffin cells appears to be a distinct substance.

NEW HISTOCHEMICAL METHODS FOR THE DEMONSTRATION OF PROTEIN-BOUND TRYPTOPHAN AND TYROSINE A CRITIQUE AND EVALUATION

G. G. GLENNER

Section of Histochemistry, LPH-NIAMD National Institutes of Health Bethesda, Maryland, U.S.A.

VAPOR PHASE REACTIONS IN HISTOCHEMISTRY: DEMONSTRATION OF HISTAMINE AND SEROTONIN IN TISSUES

E. P. BENDITT, D. LAGUNOFF and J. HOLCENBERG

The Department of Pathology of the University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

LIMITATIONS DES MÉTHODES DE DÉTECTION HISTOCHIMIQUE DES CATÉCHOLAMINES DANS LES RECHERCHES SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

M. A. GEREBTZOFF et A. DRESSE

Nous avons fait une étude histochimique et biochimique parallèle des surrénales de rats normaux et de rats dont la médullo-surrénale était en partie vidée de ses catécholamines à la suite d'injections de réserpine. Des huit techniques histochimiques essayées, trois seulement donnaient des garanties suffisantes de spécificité et de localisation: 1) l'oxydation au bichromate tamponné suivant Hillarp et Hökfelt, suivie d'un traitement développé par Gerebtzoff; 2) l'oxydation à l'iodate tamponné selon les mêmes auteurs, suivie du même traitement; 3) la fluorescence dans l'ultraviolet des produits de condensation de la noradrénaline avec le formol, selon Eränkö.

Nous avons constaté que la seconde technique manque de sensibilité: la perte de 60% du contenu en noradrénaline suffit pour donner un résultat négatif. Par contre, les deux autres techniques donnent des résultats positifs même lorsque la déplétion de la médullo-surrénale atteint 90% des catécholamines ou 93% de la noradrénaline. Cependant, ces recherches ne renseignent pas sur la sensibilité réelle des techniques, car la déplétion sous l'action de la réserpine est un phénomène discontinu de vidange successive de cellules. Appliquées au système nerveux, en particulier au tronc cérébral, les deux méthodes donnent des résultats négatifs: ou bien elles ne sont pas assez sensibles, ou bien les catécholamines se présentent à ce niveau sous une forme qui ne permet pas de les déceler dans ces conditions.

DÉTERMINATION DU POINT ISOÉLECTRIQUE APPARENT DES CELLULES ENTÉROCHROMAFFINES AU MOYEN DE COLORATION A DES pH DIFFERENTS

G. CASTOLDI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

Pour déterminer le point isoélectrique apparent des cellules entérochromaffines typiques, nous avons employé des morceaux de duodénum et de canal de Wirsung de lapin, traités au formol à 10% pendant 15 jours et inclus ensuite dans la paraffine. Des coupes de 6 à 7 microns d'épaisseur ont été successivement colorées pendant 10 minutes à une température de 24°C avec des solutions M/250 de bleu de méthylène, de cristall-ponceau et d'érythrosine, tamponnées avec du véronal Na-acétate Na, pour un intervalle de *pH* de 2 à 9, selon le procédé de A. Pischinger. Les cellules entérochromaffines de chaque coupe avaient été identifiées par fluoroscopie avant la coloration. Nous avons évalué l'intensité de la coloration par le système photométrique. Les courbes de coloration obtenues montrent que la chute de l'absorption du colorant (P.I. apparent) présente un maxima au *pH* 5,4 pour le bleu de méthylène-cristall-ponceau, au *pH* 5,9 pour le bleu de méthylène-érythrosine. L'acidophilie particulière aux cellules entérochromaffines permet de les mettre en évidence surtout aux *pH* 4,5,6: mais il est également possible d'obtenir la differenciation de ces cellules par rapport aux éléments qui les entourent, avec des colorants basiques, au *pH* 5,6,7 (bleu de méthylène), en raison de la coloration verdâtre caractéristique qu'elles fournissent, probablement à cause d'un certain degré de réduction du bleu de méthylène.

Nous avons effectué des examens de contrôle en colorant à des *pH* différents des bandes de papier chromatographique imbibées d'une solution de 5-hydroxytryptamine base, à 2%, et séchées dans un milieu d'azote. Les papiers furent directement colorés après une fixation aux vapeurs de formol à 40% pendant 4 jours. Les papiers traités au formol présentent des caractères de colorabilité tout-à-fait comparables aux résultats

obtenus sur le matériel histologique tandis que les papiers non traités au formol s'en différencient légèrement.

La désamination, selon Zorzoli et Lillie, entraîne, tant sur les coupes histologiques que sur les bandes traitées à la 5-hydroxytryptamine, une diminution notable de l'acidophilie, d'une manière à peu près uniforme pour chaque *pH*.

Ces résultats observés sur les papiers indiquent que les conditions de colorabilité des cellules peuvent être directement attribuées à la 5-HT.

OBSERVATIONS HISTOCHIMIQUES SUR LES GLANDES SALIVAIRES POSTÉRIEURES DE ELEDONE MOSCHATA

ANNA FIORENTINI

Institut d'Anatomie Comparée et Centre d'Études pour l'Histochimie du C.N.R. de l'Université de Pavie

Les glandes salivaires postérieures de *Eledone moschata*, fixées dans le formol, présentent des cellules farcies de granulations d'une couleur jaune brunâtre et douées de fluorescence à la lumière de Wood, jaune d'or. Tant leur couleur propre que la fluorescence représentent une caractéristique qui surgit par suite de la dénaturation des granulations, due à la fixation dans le formol. En effet, le matériel traité selon la méthode de la congélation-dessication, simplement déparaffiné et non fixé, ne présente qu'une très faible coloration jaune qui lui est propre au niveau des granulations et pas de fluorescence appréciable; un traitement successif avec des vapeurs de formol provoque l'apparition à brève échéance (40′ environ) d'une fluorescence jaune qui s'accentue de plus en plus. La réactivité des granulations non dénaturées, recherchée avec des réactifs gazeux, a démontré que les granulations noircissent avec les vapeurs d'acide osmique et brunissent sous l'action des vapeurs d'iode. Les mêmes vapeurs démontrent une réactivité à peu près nulle sur du matériel précédemment fixé.

Les procédés de dépigmentation employés sur du matériel fixé dans le formol avec l'hypochlorite de sodium, l'acide chromique, le permanganate de potassium et l'acide oxalique n'ont pas provoqué de variations appréciables de la couleur, tandis que les eaux sulfureuses ont provoqué un virage de couleur vers le jaune vert. Le traitement à l'eau oxygénée à 60 volumes a provoqué la dépigmentation presque totale.

CARACTÉRISTIQUES HISTOMORPHOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES DES GLANDES GRANULEUSES DE RANA LATASTEI

C. CONRIERI

Institut d'Anatomie Comparée et Centre d'Études pour l'Histochimie du C.N.R. de l'Université de Pavie

Les données biochimiques et de chromatographie sur papier indiquent pour beaucoup d'espèces la présence de plusieurs substances indoliques et phénoliques dans le venin des Amphibiens anoures. On peut de même parler de secrétions multiples sur des bases histomorphologiques et histochimiques.

Bombinator: glandes à granulations grosses et petites, présentant des réactivités et des fluorescences différentes.

Bufo: glandes métachromatiques et basophiles, ou non.

Rana: glandes à fluorescence blanche et jaune.

Un nouvel exemple de complexité histomorphologique et histochimique nous est donné par *Rana Latastei*. Il existe des glandes à petites granulations, fluorescent en jaune, présentant une remarquable réactivité pour les réactions argentaffine, iodaffine, chromaffine, et des glandes moins nombreuses à granulations beaucoup plus grandes à fluorescence blanchâtre, à l'argentaffinité très faible ou même inexistante, à la diazoréaction plus notable du moins apparemment. Malheureusement, pour *Rana Latastei*, nous ne possédons pas de données biochimiques nous permettant de préciser si à cette multiple composition histologique correspond ou non une multiple composition biochimique.

THE NITROUS ACID-NAPHTHYLETHYLENEDIAMINE REACTION FOR THE HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF INDOLES

L. E. THOMAS

Biochemistry Research Department Good Samaritan Hospital, Portland, Oregon (U. S. A.)

When the histochemical procedure using nitrous acid and N-(1-naphthyl) ethylenediamine for the demonstration of the tryptophan and other indoles was introduced, it was proposed that the action of the nitrous acid led to the formation of a N-nitroso compound. Meanwhile certain findings have led to a different proposal. The formation of a C-nitroso compound is proposed. This reaction is discussed. It is proposed that further action of the nitrous acid and an excess of hydrochloric acid reduces the nitroso compound and converts it to a diazonium compound. This is similar to the reaction of tyrosine and certain other phenols with nitrous acid.

The product of the action of nitrous acid on tryptophan (the diazonium derivative) will couple with naphthylene derivatives other than N-(1-naphthyl) ethylenediamine under suitable conditions and the diazonium derivative formed from tyrosine will couple with N-(1-naphthyl) ethylenediamine in acid solution. Tyrosine does not, however, interfere with the original tryptophan procedure because it forms a diazonium derivative much slower than does tryptophan. The diazonium compound formed from tyrosine and that formed from tryptophan are light-sensitive, the former being more sensitive than the latter. Previous treatment of tryptophan with excess formaldehyde blocks the reaction. The product of the reaction of these two compounds has been reported to be a derivative of 3-carboline.

The chemistry of the various reactions and their significance in the histochemical demonstration of indoles is discussed.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES MÉLANOCYTES

M. SACCHI

Clinica Dermatologica dell'Università di Pavia e dal Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R. dell'Università di Pavia

On connait les étapes chimiques de la mélanonogenèse de la tyrosine: tyrosine, tyramine, dopa et dopamine. On peut rappeler aussi celle de l'adrénaline et de la noradrénaline.

À un certain stade de la mélanogenèse, la cyclisation de la chaîne latérale conduit à des noyaux indoliques qui, dans le schéma de Raper sont l'acide 5, 6 di-oxindolcarboxylique et le 5, 6 dioxindol. En outre des corps indoliques initiaux peuvent être le tryptophane et la tryptamine. L'explication des données histochimiques concernant les mélanocytes doit pouvoir entrer dans cet ordre de suppositions chimiques. Les réactions diazo-alcaline, iodaffine, chromaffine ont toujours été négatives. Les seules réactions des phénols positives sont l'argentaffine et la Schmorl. Le tétracétate de plomb-Schiff. et l'acide périodique-Schiff. que peut bloquer l'anhydride acétique, donnent aussi des réactions positives. Le traitement au diazométhane, destiné à bloquer les OH phénoliques, ne diminue pas l'argentaffinité.

Il n'est pas facile de donner une explication satisfaisante de ces faits. On pourrait expliquer le fait que les réactions diazo, chromaffine et iodaffine sont négatives en supposant que cela est dû à une trop faible réactivité qui ne rejoint pas le seuil de sensibilité.

En ce qui concerne la réaction PAS positive, comme il faut écarter la possibilité de rupture d'un double lien, en raison du fait qu'elle peut être bloquée par l'anhydride acétique, on peut penser à une rupture de Criegee d'après ce qu'a décrit Lillie au sujet de la distinction entre adrénaline et noradrénaline, en une oxydation qui conduit aux adrénochromes respectifs, ce qui peut favoriser un diagnostic plus précis.

SUBSTANCES PHÉNOLIQUES DES VITELLOGÈNES DE DISTOMA HEPATICUM

L. CORONA

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

La différenciation des substances contenues dans les cellules vitellogènes des Plathelminthes, par rapport à celles que contiennent les cellules entéraminogènes et les cellules adrénalinogènes et noradrénalinogènes, est relativement facile; il est au contraire difficile d'établir un diagnostic plus exact pour préciser s'il s'agit de substance di- ou polyphénolique, en position orto ou para.

Nous avons examiné la question au sujet du Distoma hepaticum.

On connait bien le caractère de fixabilité dans l'alcool qui permet également d'obtenir des données histochimiques différentielles de valeur générale. On ne savait pas, au contraire comment se serait comportée la substance par suite du traitement de congélation-dessication.

Nous avons établi une comparaison entre le matériel fixé dans l'alcool et le matériel fixé dans le formol d'une part, et d'autre part, autant que possible, avec le matériel obtenu par congélation-dessication.

Nous avons expérimenté de nombreuses réactions parmi celles qui ont été proposées pour les substances phénoliques et indoliques et nous en avons tiré divers éléments nouveaux tels que:

– la chromaffinité, la diazoréaction acide et alcaline du matériel fixé par l'alcool et par le formol;

– la corrélation entre certaines réactions d'oxydation dans le matériel fixé d'une façon ou de l'autre et préparé selon la méthode de congélation-dessication;

– une certaine possibilité de bloquer les fonctions phénoliques au moyen du diazométhane (diazoréaction et réaction argentaffine);

– la positivité des réactions à la paradiméthylaminobenzaldéhyde, au xanthydrol, au rosindol et de celle de Morel et Sisley.

Cependant ces résultats, bien que positifs, ne suffisent pas pour établir un diagnostic plus précis; toutefois le modèle histochimique que constituent les vitellogènes des Plathelminthes s'est révélé très intéressant.

ACTION DE L'HORMONE SOMATOTROPE PRÉHYPOPHYSAIRE SUR LES CELLULES ENTÉROCHROMAFFINES DE RAT

E. MIRA

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

Dans les recherches sur l'histochimie des localisations de 5-HT et en particulier sur les cellules entérochromaffines, les études histopharmacologiques ont donné de bons résultats.

En tenant compte de différentes observations précedentes, j'ai étudié l'influence de l'hormone somatotrope préhypophysaire sur le nombre et sur les caractères des cellules entérochromaffines intestinales.

J'ai utilisé 12 rats mâles, pesant en moyenne de 200 à 220 gr, répartis en 4 lots de 3 animaux chacun: un lot de contrôle et 3 lots traités en injectant journellement par voie intrapéritonéale, respectivement 5, 10 et 20 U.E. d'hormone somatotrope Choay pendant 8 jours consécutifs. Tous les animaux ont été sacrifié 24 heures après la dernière injection, Dans chaque animal nous avons pris en considération deux portions intestinales (duodénum, iléon), fixées pendant 10 jours dans le formol neutre à 10% et incluses dans la paraffine. Nous avons effectué des coupes transversales de ces préparations, de l'épaisseur de 8 microns et sur ces coupes nous avons effectué la réaction de Masson–Hamperl. Pour chaque animal j'ai examiné à fond trois coupes de chacune des deux localisations choisies, comptant et classifiant les cellules entérochromaffines se trouvant dans les villosités intestinales et dans les dépressions glandulaires correspondantes d'un anneau intestinal entier, en déduisant un "indice de granulation pondéré" selon le schéma proposé par Ghiringhelli et Mira (1959).

. Les animaux traités présentent une augmentation des cellules entérochromaffines d'autant plus grande que la dose d'hormone administrée était plus forte. Cette augmentation est plus accentuée dans le duodénum que dans l'iléon, et pour une même portion intestinale elle est plus accentuée dans les dépressions glandulaires que dans les villosités.

L'indice de granulation pondéré présente en proportion une augmentation nettement supérieure à celle du nombre des cellules. On observe aussi des modifications morphologiques correspondant en partie à celles que des Auteurs précédents ont décrites, et qui feront l'objet de recherches ultérieures lesquelles comprendront également l'étude des cellules préentérochromaffines argentophiles.

OBSERVATIONS INTERFÉROMÉTRIQUES SUR LES CELLULES ENTÉROCHROMAFFINES

G. GIUSEPPE

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia
e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R.

On a étudié au microscope interférentiel, les caractéristiques réfractométriques (indice de réfraction et masse sèche) du cytoplasme de cellules entérochromaffines (c.e.) et de cellules épithéliales principales (c.p.) dans le duodénum de cobaye, fixé au formol, formol-iodate de K, formol-bichromate de K, avant et après traitement avec la pyridine à chaud.

Après la fixation, les c.e. ont été identifiées en raison de leur fluorescence caractéristique à la lumière de Wood, de la granularité de leur cytoplasme au microscope en contraste de phase, et ensuite on a contrôlé leurs caractéristiques de réactivité spécifique, par la réaction argentaffine.

Les caractéristiques réfractométriques se sont révélées différentes, dans les c.e., suivant les différents fixateurs; en particulier, après la fixation au bichromate, nous avons obtenu les valeurs maxima de l'indice de réfraction et de masse sèche. Dans les c.p. nous n'avons pas relevé de différences imputables à la fixation.

Le traitement à la pyridine (à laquelle on a attribué la capacité de solubiliser, même après la fixation au formol, la secrétion des c.e.) a déterminé une modification sélective des caractéristiques réfractométriques des c.e. par rapport aux c.p. En moyenne des réductions de l'indice de réfraction et de la masse sèche de 35% dans les c.e. et de 15% dans les c.p. ont été obtenues.

Toutes les modifications observées sont à mettre en relation soit avec des variations effectives de masse, soit avec des variations de la réfractivité spécifique des constituants cytoplasmatiques, probablement dues à la présence de l'iode et du chrome.

HISTOCHIMIE DES CONSTITUANTS NON ORGANIQUES

E. HINTZSCHE

Bern

Les progrès de l'histochimie des constituants non organiques dépendent essentiellement du degré de perfection des méthodes analytiques. La recherche biologique et clinique exige en outre une plus grande sensibilité et une localisation plus grande des réactions. Tout progrès dans les méthodes, comme par exemple l'amélioration de la microincinération ou l'introduction de l'autoradiographie demande un contrôle des résultats obtenus antérieurement. C'est pourquoi il n'est pas encore possible de porter un jugement sur les techniques de localisation ou d'évaluation quantitative des substances non organiques dans les cellules, tissus et organes animaux.

Pour déterminer avec certitude la topographie de tous les électrolytes on emploie la microincinération. Elle nous éclaire sur les changements des ions minéraux qui interviennent soit au cours du functionnement des organes, soit au cours du vieillissement. Cette technique pourrait être complétée par de nouvelles réactions sur les ions du spodogramme. On peut espérer des vues nouvelles sur le métabolisme des sels minéraux grâce à la technique de l'autoradiographie.

Lors de la calcification des tissus, le rôle de certaines parties organiques de la substance fondamentale (glycogène ou mucopolysaccharides) n'est pas encore clair. A quel degré entrent-ils en ligne de compte comme source des phosphates?

Les méthodes permettant la détection du fer ont été considérablement affinées par la microscopie électronique, mais restent toutefois insuffisantes pour la recherche cytochimique.

Parmi les oligo-éléments le zinc a été étudié de près. Mais pourquoi sa présence dans les nucléoles?

Les déplacements des ions aisément diffusibles tels que le sodium, le potassium et le chlore lors de l'excitation du muscle ou du nerf n'ont pu être mis en évidence par l'histochimie. Retenons qu'il y a corrélation entre la quantité de glycogène (ou d'autres polysaccharides) et la teneur en potassium comme cela a également été établi par les méthodes bio-

chimiques, dans différents organes et tissus comme le tissu musculaire strié, le foie, la substance fondamentale cartilagineuse, les glandes muqueuses et sudoripares ainsi que les mastocytes. La signification biologique de cette combinaison nous échappe encore.

Parmi les anions, surtout le chlore nous intéresse. On peut se demander si les grandes quantités du chlorure de sodium qu'on trouve partout n'empêcheront pas de détecter des concentrations variables de chlore au cours du fonctionnement d'un organe.

Des réactions histochimiques biologiquement importantes ont trouvé aujourd'hui un champ d'application également en embryologie et en pathologie. En outre, la détection des matières non biologiques est importante pour les toxicologues et les médecins légistes. Tous ces problèmes ne pourront être résolus qu'à l'aide de méthodes variées appliquées de façon critique; son amélioration donnera un nouvel essor à l'histochimie des corps non organiques.

HISTOCHEMIE DES EISENSTOFFWECHSELS DER ZELLE

P. GEDIGK

Pathologisches Institut der Universität Bonn

Das Eisen wird in den speichernden Zellen in zwei verschiedenen Formen abgelagert, nämlich in der leicht mobilisierbaren Eisen-Eiweissverbindung Ferritin und als Hämosiderin. Beide Depoteisenfraktionen können ineinander übergehen. Das Hämosiderin entsteht, wenn die Zelle mehr Eisen enthält als durch Apoferritin gebunden werden kann. Bei einem überschüssigen Eisenangebot werden von den Zellen Proteine, Mucopolysaccharide (bzw. Glykoproteide) und in geringem Umfange auch Lipide gebildet. Diese organischen Substanzen sind basophil und besitzen die Fähigkeit, Eisenoxyd chemisch zu binden. Sie treten genau an der Stelle der Eisenablagerungen in Erscheinung und dienen offenbar als Trägersubstanzen für das Schwermetalloxyd. Anorganisches Eisen und organische Trägersubstanz bilden zusammen das Eisenpigment.

Das Eisenpigment stellt keine unveränderlich liegende Substanz dar, die am Stoffwechselgeschehen unbeteiligt bleibt. Es steht vielmehr ebenfalls dem Eisenstoffwechsel als Depotfraktion zur Verfügung, wenn es auch nicht so leicht mobilisierbar ist wie das Ferritin.

Auch bei der intracellulären Ablagerung anderer Schwermetalloxyde und bei der Speicherung von Siliciumdioxydderivaten entstehen dem Eisenpigment analoge Blei-, Silber und Kupferpigmente oder SiO_2 – haltige Granula, welche sämtlich einen spezifischen organischen Baustein und eine histochemisch einheitliche, offenbar unspezifische, organische Komponente, die organische Trägersubstanz, besitzen. Die anorganischen Anteile dieser "Pigmente" lassen sich experimentell gegeneinander austauschen. Die organische Trägersubstanz ist also keine Besonderheit des Eisenpigmentes. Ihrer Bildung liegt vielmehr eine allgemeine – weitgehend unspezifische – Zellreaktion bei der intracytoplasmatischen Speicherung anorganischer Stoffe zugrunde.

Die elektronenmikroskopische Verfolgung der Eisenspeicherung ergab, dass Makrophagen anorganisches und organisches Eisen auf dem Weg der Invagination und Vesiculation der Zellmembran in das Cytoplasma einschleusen. Die hierbei entstehenden "primären" intracytoplasmatischen

eisenhaltigen Vakuolen werden allmählich in Sideringranula (bzw. Siderosomen) umgebaut. Dabei werden die Eisenpartikel zunächst zu 150 Å grossen Micellen umgelagert. Gleichzeitig gibt die Zelle in diese Vacuolen ein relativ kontrastarmes Material ab, welches die Micellen umgibt und hauptsächlich die organische Trägersubstanz darstellt. In älteren Eisenablagerungen erfolgt dann eine allmähliche Umwandlung der Eisenpartikel in die 55 Å grossen viereckigen Micellen des Ferritins. Präformierte Cytoplasmaorganellen, wie Mitochondrien, "Microbodies" usw. nehmen in Makrophagen an der Speicherung und Verarbeitung des Eisens nicht teil.

LA FERRITINE DES PLEXUS CHOROÏDES

P. PONCELET

Après avoir déterminé que le fer ionisable des plexus choroïdes se trouve, en grande partie au moins, sous forme de ferritine, l'auteur étudie la localisation précise de ce pigment ferrique dans ce tissu. Il montre ensuite la variabilité suivant les espèces, certaines ne possédant pas le pigment, et d'après le sexe: la ferritine est nettement plus abondante chez la femelle.

Passant au stade expérimental de ce travail, il montre les effets des injections de pilocarpine et de chlorure ferreux.

Considérant enfin le rôle éventuel de la ferritine dans les ferments respiratoires, il s'attache à rechercher s'il n'y a pas une relation entre la présence de ferritine et celle de lactoflavine. Mais il n'a pu déceler cette dernière par la technique histochimique employée, soit que celle-ci soit peu sensible, ou bien à cause d'un manque de liaison entre la lactoflavine et un substrat protidique.

ZUR METHODIK DES HISTOCHEMISCHEN EISENNACHWEISES

R. NETH

Universitäts-Kinderklinik, Hamburg-Eppendorf

Mit Hilfe der Sulfid-Silber-Methode von TIMM lassen sich lichtmikroskopisch in normalen Organen in grösserem Umfang Metalle nachweisen als man aufgrund der bisherigen Untersuchungen erwarten konnte. Aufgrund histochemischer Differenzierung der einzelnen Metalle und quantitativ chemischer Untersuchungen scheint es sich vor allem um Eisen zu handeln. Eine Bestätigung dieser Befunde durch den direkten Nachweis des Eisens als Turnbullblau oder Berliner Blau war in den meisten normalen Organen mit Hilfe der üblichen Vorschriften nicht möglich. Deshalb haben wir uns nochmals eingehend mit den möglichen Fehlerquellen dieser Methode auseinandergesetzt.

1. Durch Schwefelwasserstoff-Alkohol-Fixierung der Gewebstücke kann das Eisen als Eisensulfid ausgefällt und dann durch Stückfärbung mit Kaliumferricyanid als Turnbullblau dargestellt werden, ohne dass sich ein Teil des Eisens durch Verlagerungen dem histochemischen Nachweis entzieht, wie wir es bei allen anderen Vorschriften, bei denen normaler Alkohol oder Formalin zur Fixierung benutzt wurde, gesehen haben. Durch einen Vorgleich quantitativ-chemischer Eisenanalysen und der histochemischen Befunde mit dieser Methode wird gezeigt, dass auch in normalen Organen der direkte Nachweis des Eisens in grösserem Umfang möglich ist als bisher angenommen wurde.

2. In Modellversuchen mit reiner Ferritinlösung und Ferritinkristallen kann gezeigt werden, dass das Ferritin-Eisen als Eisensulfid ausgefällt und als Berliner Blau dargestellt werden kann und somit, eine genügend grosse Menge vorausgesetzt, histochemisch nachweisbar ist.

3. Die Überprüfung der Methoden zum Nachweis des sogenannten maskierten Eisens in den Eisenporphyrinverbindungen ergabe, dass es sich bei dem mit dieser Methode dargestellten Eisen, z.B. in den Kernen, um Artefakte handelt, die durch Verlagerungen vor allem des Gewebs--Eisens an die eisenaffinen Orte entstanden sind.

COMPARATIVE HISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON HEMOSIDERIN AND FERRITIN

A. SHODEN and P. STURGEON

Previous experiments from this laboratory demonstrated when large amounts of iron were given to rabbits by the parenteral route, that the quantities found by biochemical analysis in the form of soluble iron (ferritin) and insoluble iron, vary 1) with the dose administered, 2) the time interval from injection to analysis and 3) with the nature of the compound administered. The insoluble iron granules which can be isolated from tissue homogenates after preliminary water extraction of ferritin, generally are assumed to be identical with the microscopically visible granules which give a positive Prussian blue stain in histologic section; both are commonly called hemosiderin.

Comparative studies on hemosiderin estimated by these different methods have not been made. It was decided, therefore, to re-evaluate with histochemical techniques in parallel with our biochemical methods, the variables brought out in our previous experiments.

These studies show that iron injected as the saccharated oxide, even in small amounts, result in a marked increase in the stainable iron of the Kuppfer cells, while none appears in the parenchymal cells. With time, the Kuppfer cell iron gradually decreases. Biochemically, this is associated with a decrease in the insoluble and an increase in the soluble fraction. With larger doses, as total ferritin iron exceeds 180 mg, further increases in liver iron are reflected to a greater extent in the insoluble than the soluble fraction. Kuppfer cell iron increases but little; however, fine granules begin to appear in the parenchymal cells; the increase in these granules parallels that of the insoluble fraction. At these higher levels, without further load but with time, there is, as at low levels, a decrease in Kuppfer cell iron. However, in contrast to the changes observed at low levels, there is a reciprocal increase in parenchymal granules, but biochemically, there is no significant change in insoluble or soluble iron.

With iron dextran, stainable iron is not detected in either Kuppfer or parenchymal cells until the total liver iron reaches 200 mg. Up to this level, the quantity of insoluble iron is negligible; however, ferritin iron

increases approximately 30 fold (from a normal of 6 to 180 mg). With additional iron load, there is an increase in the parenchymal iron granules which closely parallels the increase in the insoluble fraction.

These studies show that with the administration of certain iron compounds to rabbits, significant quantities of iron are present in the liver which the histochemical method fails to disclose. On the other hand, according to the compound administered, insoluble iron granules may be deposited in the Kuppfer cells, parenchymal cells or both; the biochemical method does not distinguish between insoluble iron from these sources.

L'HÉTÉROGÉNEITÉ FONCTIONNELLE DU TUBE URINAIRE PROXIMAL DEMONTRÉE PAR UNE DISTRIBUTION EXPÉRIMENTALE DE MATIÈRES EN CIRCULATION DANS LE REIN DU RAT

J. B. LONGLEY, M. B. BURG, et H. J. BURTNER

On trouve souvent que des substances localisables administrées par injection intraveineuse s'accumulent dans certains endroits du rein. Leur localisation précise est rarement possible à cause de la solubilité des substances en jeu, mais la corrélation du mode d'accumulation avec la distribution structurale du rein permet souvent une localisation plus précise que par un examen macroscopique. Des lieux d'accumulation souvent rencontrés correspondent soit au segment contourné du tube urinaire proximal (substance corticale), soit au segment droit du tube urinaire proximal (bande externe de la zone extérieure de la substance médullaire). Une répartition irrégulière entre ces points indique des différences quantitatives dans la fonction des deux segments, mais laisse en doute la question de savoir s'il existe des différences qualitatives. Récemment, étudiant dans le rat la trace de l'accumulation intrarénale du rouge phénol, nous avons noté que l'accumulation *in vitro* de la matière colorante (corticale) différait de cette dernière *in vivo* (bande externe). Nous avons également trouvé que cette accumulation corticale peut être produite dans des reins intacts, après n'importe quel procédé intervenant avec l'écoulement de l'urine dans le tube urinaire, c'est à dire exsanguination partielle, perfusion extracorporelle à faible pression, diurèse interrompue. Il ressort de tout ceci que l'accumulation corticale résulte, en l'absence d'écoulement d'urine le long du tube urinaire, de l'extraction du sang de la substance colorante par le segment contourné du tube proximal. L'accumulation dans la bande externe de la zone extérieure, puisque celà n'arrive seulement que pendant le passage de l'urine dans le tube urinaire, représente la réabsorption de la matière colorante par l'urine, suggérant son retour au sang, plus lentement que lorsqu'elle est

entrée dans la cellule tubulaire. L'action des deux segments envers le rouge phénol, diffère, étant orientés en positions directement opposées, au point de vue qualitatif. La distribution d'autres matières est également changée par ce procédé et fait le sujet d'une étude en cours.

THE QUESTION OF UNIDENTIFIED SUBSTANCES ON CELLULAR MEMBRANES

J. H. McALEAR

Division of Laboratories and Research, N.Y. State Department of Health, New Scotland Ave. Albany, N.Y. U.S.A.

Examples of commonly occurring structures on the cellular envelope and organelles are illustrated. Included are the components of desmosomes as seen in five major phyla, granules oriented on cytoplasmic membranes, nuclear and outer mitochondrial membranes. Evidence is presented for an intracellular membrane cement in the mitochondria and Golgi, and the orientation of the elements of the mitochondrial matrix upon the inner surface of the membranes of the cristae. The implication of such organization of elements, with respect to cellular membranes in terms of the concepts of cellular organization, is discussed, and the technical aspects of the problem of identifying these structural elements as specific substances or enzymes are outlined.

FURTHER STUDIES ON THE LOCALISATION OF RENIN IN THE KIDNEY

J. BING and J. KAZIMIERCZAK

As the chemical structure of renin is unknown, the specific histochemical method for renin localisation in the kidney cannot be employed.

Our studies are based on determination in rats of the pressor response to intravenous injection of extracts of fragments of the periglomerular circumferences of the outermost layer of glomeruli. The results showed that renin is located in macula densa or (and) in other cells lying around the vas afferens, but so far it cannot be said exactly in which of the perivascular cells. Nor has it been possible to give the final answer to the question about the renin content of the vasa afferentia, as the small amounts found in some of the extracts of these vessels may be due to insufficiency of the removal of the adjacent cells from the vasa afferentia.

HISTOCHIMIE APPLIQUÉE

DIE HISTOCHEMIE DES BINDEGEWEBES

LINDNER

Hamburg

In dem einleitenden Referat werden an hand übersichtlicher Schemata und praktischer Beispiele die histochemischen Verfahren dargestellt, welche nach allgemeinen und eigenen Erfahrungen zur Untersuchung gesunder und erkrankter Bindegewebe notwendig sind. Die Prüfung dieser Verfahren an isolierten Stoffen und Stoffgemischen, speziell der Grundsubstanz in vitro, auf Objektträger, Papier etc. sind sinnvoll. Die Ergebnisse können jedoch nur bei Einhaltung absolut gleicher Voraussetzungen (einschließlich der Fixierungseffekte) mit den Befunden am Schnittpräparat verglichen werden. Für derartige Vergleichsuntersuchungen sind bestimmte Testpräparate besonders geeignet (speziell die embryonale Bindegewebsentwicklung, Knorpelanlagen usw.). Die 3 Bestandteile des Bindegewebes-Zellen, Fasern und Grundsubstanz – werden z.T. mit gemeinsamen, z.T. mit speziellen histochemischen Methoden untersucht. Die Grundsubstanz steht in der histochemischen wie in der biochemischen Erforschung des Bindegewebes an erster Stelle. Die Verfahren der Grundsubstanz Histochemie sind aber auch für die Untersuchung der Zellen und Fasern des Bindegewebes unerlässlich, 1. weil Bildungs, Transformation und Abbau der Grundsubstanzbestandteile in den Bindegewebszellen erfolgen und 2. weil alle drei Arten von Bindegewebsfasern (von der Bildung bis zum Abbau) in unmittelbarem räumlichen Zusammenhang mit den Grundsubstanzen stehen. Bei der Grundsubstanzhistochemie unterscheiden wir Polysaccharid-, Protein- und Lipidbausteinanalysen. Die Substratdifferenzierungen sind kompliziert. Sie benutzen dabei neben den zahlreichen Kontroll- und Vergleichsverfahren verschiedene Enzyme und chemische Agentien. Derartig umfangreiche Untersuchungen sind für differenziertere Aussagen erforderlich, wenn man die Verschiedenheit der Bindegewebsgrundsubstanzen auch innerhalb kleiner Areale einer Bindegewebsstruktur berücksichtigt (z.B. in Membranen, Gefäßwänden, Knorpel, Knochen, Granulationsgewebe, parablastomatöses Bindegewebe usw.). Uneinheitlich sind die Faser-Grundsubstanzen, besonders aber die intrazellulär nachweisbaren Bestandteile derselben. Über die differenzierte histochemische Untersuchung der Faser-Grundsubstanzbeziehungen wird getrennt vorge-

tragen. Die Bindegewebszellen werden dagegen näher besprochen. Wir zeigen eingehend und übersichtlich, welche Fermente in den einzelnen Zellformen nachweisbar, bzw. unter den Anforderungen genau definierter Versuchsbedingungen aktivierbar sind. An hand entsprechender Beispiele wird somit gezeigt, welche Einblicke histochemische Verfahren heute bereits in den Stoffwechsel gesunder und erkrankter Bindegewebe zulassen.

HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF SOME MECHANISMS OF REGENERATION, MATURATION AND AGING OF CONNECTIVE TISSUE

B. B. FUCKS

Laboratory of histochemistry, Department of experimental biology and pathology, Institute of Experimental biology and medicine of the Academy of sciences of the USSR

1. The basis task of some investigations summarized here represents the analysis of the mechanisms of the regeneration, maturation and aging of the connective tissue.

2. The histochemical analysis of albumen, mukopolysaccharides and some ferments has been made.

3. The following methods have been used while studying some sections of animals and human skin and aorta. In the experiments Danielly's reaction with use of tetrazoted diorthoanisidine, Millon's reaction, Sakaguchi's reaction, the determination of ∝-amino acids by Iasuma and Ischikava, the reaction using DNFB, the determination of sulfhydrill groups by Yakovlev and Nistrativa, by Barnett and Seligman were used.

We have also applied the method suggested by our laboratory. This method is based on the reaction with amino groups of pration 5 BC containing mobile chlorine in its structure.

The fibres reconstituted from procollagen solution were studied in model experiments. The mucopolysaccharides were analysed with the help of toluilene and methylene blue with the range of PH, by means of Hale colloid iron method, PAS-reaction and alcian blue as well. We have also made the differential analysis of esterases using as substrata ∝- and β-naphtylacetate, six acetylated naphtol AS and Twin 60 and Twin 80 preparations; some dehydrogenases have been studied with the help of neotetrazolium as well. Besides in the course of investigation we used the methods of the biochemical analysis of albumes, mucopolysaccharides and ferments, which were performed in fixed and unfixed sections (acetilation, benzoilation, methylation, iodination, desulfation, desamination, extraction, fermentative digestion, inhibition and activation of ferments and others).

4. In the course of studying the ferments of the regenerating connective tissue the activization of non-specific esterases in fibroblast protoplasm was demonstrated in the phase of the most intensive formation of procollagen and in the phase of the formation of the definitive collagen bundles.

5. It has been noted that collagen as well as elastic fibres posses different chemical character in different organs.

6. The amount of collagen albumens in the cement substance of collagen bundles increases with age.

7. The regular age chemical changes of the collagen and elastic fibres have been observed.

8. The collagen fibres suffered the cycle of regular chemical changes in the process of scar formation. The most essential manifestation of these changes lies in the facts that the solubility of collagen gradually falls, the accessibility and ability to chemical reaction of different chemical groups of albumen and mucopolysaccharides of collagen fibres gradually decrease.

9. While healing the main tendency in the development of collagen structures is the substitution of stronger hydrogen and probably covalent bonds for water and some salt links of some chemical components of fibres. The possibility of transforming such a polyphase and polycomponent system as a young collagen fibre into a giant, complex molecule. (the fibre in the scar) is being examined. We are examining the relations between these changes of paraplastic structures on the one hand and the gradual fall of metabolism on the other hand.

10. We have already received some data on the possibility of the reverse development of some abovementioned changes while transplanting the human skin on the allantochorion of chick embryo.

THE OXYTALAN CONNECTIVE TISSUE FIBER IN HEALTH AND DISEASE

H. M. FULLMER

National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Public Health Service, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda 14, Maryland

Oxytalan connective tissue fibers have recently been demonstrated to be a normal constituent of periodontal membranes of man. Histochemical evidence indicates that they differ from all previously described connective tissue fibers. They are stained with the peracetic acid-aldehyde fuchsin-Halmi and the peracetic acid-orcein-Halmi methods. They resist digestion with elastase unless they are pre-oxidized with peracetic acid. They are believed to contain a protein and a mucopolysaccharide component. The latter is digested by lysozyme, and by either β-glucuronidase or testicular hyaluronidase provided the fibers are pre-oxidized with peracetic acid. Their presence and distribution in structures such as periodontal membranes, ligaments, tendons and mucous connective tissues as well as their composition as revealed by histochemical methods would tend to suggest that they represent specially modified or immature elastic-like tissues.

During the course of embryonic development of the jaws in man, it was noted that abundant mucopolysaccharide and well developed collagen bundles were demonstrable before oxytalan fibers appeared. They appear to develop from a mass of mucopolysaccharide between bundles of collagen, and are first demonstrable in the oral mucosa of embryos at approximately 6 months of age. They develop in connective tissues destined to become periodontal membrane as Hertwig's sheath proliferates apically, and are inserted into the cementum as Hertwig's sheath fragments. They apparently increase in size and number with functional development.

An inherent capacity of periodontal connective tissue cells to produce oxytalan fibers under pathological conditions was also discovered. During the course of dental granuloma and radicular cyst formation, old bone and connective tissues are destroyed and new tissue develops. Oxytalan fibers clearly develop in this new repairative tissue in a manner

analagous to that during embryogenesis; and they develop in the supportive connective tissue of ameloblastomas.

Sometimes it appears that oxytalan fibers are more resistant to the degradative influences of periodontal disease than is collagen since they are sometimes present when the immediately surrounding collagen has been destroyed. However, they are also eventually destroyed. Many new oxytalan fibers appear to develop immediately inferior to the cells of the epithelial attachment as it proliferates apically with the progression of periodontal disease. They also develop in the new repairative tissue of the periodontal membrane consequent to periodontal disease.

HISTOLOGICAL LOCALIZATION OF FLUORESCENT SERUM PROTEINS AND THYROID-STIMULATING HORMONE IN THE CONNECTIVE TISSUE OF THE RAT

R. E. MANCINI, O. VILAR, J. M. DELLACHA, O. W. DAVIDSON and B. ALVAREZ

Instituto de Anatomía General y Embriología, Facultad de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Rat total serum, albumin, globulins and fibrinogen (native or denaturated) were labeled with a fluorescent dye (Lissamine-Rhodamine B 200) following Chadwick's method with slight modifications. Changes in the nature of these proteins were checked by paper electrophoresis and anaphylactic shock in guinea-pigs.

Several Armour and U.S.Public Health pituitary hormones preparations (TSH, FSH, LH, ACTH, MSH, STH and Prolactin) active and denaturated, were labeled with the same fluorescent dye. The amount of dye bound to these proteins and hormones was spectro-photometrically determined. Changes in the biological activity of some of these hormones were checked using biological methods.

Labeled serum proteins or hormones were *i.v.* injected in rats or mice and the animals were killed between three minutes and twelve days. Blood and urine samples were taken just before sacrifice for measuring the decay of the labeled proteins and hormones in the circulation and its elimination by the kidney. As a control, another lot of rats were injected with Lissamine-Rhodamine solutions alone. All tissues were fixed in buffered formalin and frozen or paraffin sections examined with the fluorescence microscope.

It was observed: 1) the decay of serum proteins in the circulation showed a fast and a slow component. The first is correlated with the presence of fluorescent proteins in the lumen and wall of the capillaries and then trasppassing the vessels in the neighboring connective tissue of different organs (capsules, septa, interstitium, basal membranes, tendons, perichondrium). The slow component of the curve is correlated

with accumulation of proteins in the Kupffer cells and other macrophages and in the cells of the convoluted proximal tubules of the kidney.

2) Denaturated labeled serum proteins decay faster in the circulation and predominantly stored in the macrophages and kidney.

3) Fluorescent dye solutions dissappeared rapidly from the circulation and they were eliminated in the urine and trough the choledocus in the small intestine. It was detected in very small amounts in the macrophages and in the cells if convoluted proximal tubules of the kidney.

4) Of all labeled hormones used, which showed differents and selective sites of localization, only TSH was found in the connective tissue. It decay rapidly in the circulation, appeared inmedialy attached to the basal membrane of thyroid follicle and later in the connective tissue of some ocular structures, in the interstitium of skeletal muscle, periviceral adipose tissue and in the mast cells. Denaturated labeled TSH decay faster in the circulation did not appeared in the thyroid gland but could be seen with lesser intensity in the connective tissue structures. Finally all the labeled hormones were accumulated by macrophages of the RES and by the cells of convoluted proximal tubules.

A COMPARATIVE PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF PRECOLLAGEN AND COLLASTROMINE

A. A. TUSTANOVSKY

The State Institute of Rheumatism
of the Ministry of Health, Moscow, RSFSR

According to our pertinent data the collagen (the primary collagen fibril) of mature connective tissue is considered as a product of precollagen and collastromine combination. At the initial stages of both embryonic development and formation of connective tissue only the fibers of precollagen are formed. The participation of procollagen at this stage has not been proved as yet. The properties of precollagen and collastromine studied so far are practically identical. The precollagen fibers of pig's embryonic skin were isolated as preparations. It was established that these fibers are closely related with the nuclei of mesenchymal cells. Histochemical, chemical, electronmicroscopical and X-ray structural analyses confirmed that precollagen is an embryonic form of collastromine.

ANWENDUNG HISTOCHEMISCHER LIPIDVERFAHREN IN RAHMEN DER BINDEGEWEBSUNTERSUCHUNGEN

L. HOLCZINGER

Onkopathologisches Forschungsinstitut, Budapest

Biochemische und polarisationsoptische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die retikulären Fasern auch Lipide enthalten, doch lassen sich diese mit gewöhnlichen histochemischen Verfahren nicht nachweisen.

Unsere, an Rattennieren durchgeführten Versuchen setzten sich die Klarstellung der Frage zum Ziel, ob in den in verschiedenen Lösungen fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten mit Hilfe der einfachen Fettfärbeverfahren in den Basalmembranen Lipide Nachgewiesen werden können und bejahendenfalls, welche Lösungseigenschaften sie besitzen.

Unter den benützten Fixierungslösungen ist es die Bouinsche-Lösung, die es ermöglicht, in Nieren – nach Fixierung und nachfolgender Einbettung in Paraffin – eine starke positive Färbung nicht bloss der Bürstensaum und der Mitochondrien, sondern auch der Memrana basalis, die Glomeruli, der Bowman-Kapslen sowie der Gefässwände zu erzielen. Mit dem überschüssigen Farblösungsmittel liessen sich die Farben entfernen, wonach die Strukturen neuerlich gefärbt werden konnten. Wurden die Gewebsstückchen vor der Fixierung in fliessendem Wasser gewaschen oder mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert, dann zeigte sich eine starke Verminderung der Struktur-Förbung.

Die Versuche lassen darauf schliessen, dass die Lipide in den retikulären Fasern in Gestalt von Lipoprotein anwesend und zum Teil wasserlöslich sind.

HISTOCHIMIE DES FIBRES RÉTICULAIRES AU COURS DES INVESTIGATIONS POLARISÀNTES

J. SUGÀR

Onkopathologiai Kutató Intézet, Budapest

La réticulaire des membranes basales montre en général une biréfringence positive. D'après les recherches de Missmahl la structure longitudinale fibrillaire est liée par une chaîne moléculaire lipide, transversale; à l'issue de cette structure la biréfringence des fibrilles devient négative par suite d'une inhibition à la glycérine.

Dans nos investigations sur la membrane basale du rein nous avons étudié cette structure interfibrillaire. Il fut observé à quel moment un changement se produit après fixation, et après utilisation de différents solvants des corps gras au cours d'une biréfringence de la réticulaire. En exécutant une fixation au formol, puis un montage en milieu liposoluble, suivi d'un refroidissement des coupes, la membrane basale indique une biréfringence positive. La situation change cependant fondamentalement, lorsqu'on pratique une fixation des reins dans l'alcool et qu'on les monte à la paraffine. Malgré que le corps gras fut traité par les solvants et recouvert de glycérine, il présente une biréfringence négative, pareille à la coupe congelée mais non traitée par aucun solvant.

On a réussi à démontrer biochimiquement la présence de lipides dans la réticuline mais par une méthode histochimique, on n'y trouvait aucune trace de corps gras. C'est la fixation de Bouin qui a fourni une réaction positive.

En considérant nos recherches on peut constater les points suivants: dans les structures interfibrillaires peuvent se former d'autres chaînes transversales à côté des lipides (Brewer). L'attitude de la biréfringence de la structure fibrillaire et le comportement de la réaction histochimique sont influencés en plus par la méthode de la fixation.

HISTO- ET BIOCHIMIE DES FOYERS INFLAMMATOIRES

A. DELAUNAY et SUZANNE BAZIN

Institut Pasteur, Garches, Seine et Oise, France

Dans les foyers inflammatoires prennent place, comme il est facile de l'imaginer, d'innombrables processus chimiques qui sont à la fois cause et conséquence des remaniements de tous ordres dont est le siège le tissu atteint. Ces processus se traduisent, d'une part, par des variations souvent importantes des constituants normaux de la trame conjonctive et, de l'autre, par l'apparition de constituants nouveaux. Quelques uns, parmi ces derniers, sont amenés par le plasma sanguin, d'autres par des globules blancs échappés au torrent circulatoire, d'autres, enfin, sont la conséquence d'une activité exacerbée des cellules conjonctives.

Dans le rapport ici présenté, nature, variations pondérales et, au besoin, propriétés particulières de tous ces constituants sont passées en revue. L'ensemble comporte cinq grands chapîtres qui ont pour titres: 1) les mucopolysaccharides, 2) le collagène, 3) l'eau, les protides, les glucides, les lipides, les acides nucléiques, enfin les cations, 4) les enzymes, 5) le *pH*.

Le lecteur qui a tourné ces pages ne sera pas sans remarquer les vastes lacunes que comportent encore nos connaissances. Mais, au même moment, devant l'acquis de ces quinze dernières années, il saura rendre grâce aux efforts conjugués des histochimistes et des biochimistes.

COMPARATIVE HISTOCHEMICAL STUDY OF HUMAN AND EXPERIMENTAL ATHEROGENESIS

I. E. GONZALEZ

University of Alabama Medical Center, Birmingham, Alabama

Gonzalez and co-workers (*Am. J. of Physiology* **197**, 413, 1959) have shown that the earliest intimal lesion noted in canine atherogenesis is characterized by an accumulation of PAS-positive substance. Alterations in the intercellular substance preceded lipid accumulation.

Current studies relating to human atherogenesis indicate that acid phosphatases and non-specific esterase activity is intimately associated with intimal proliferation and the first discernable lesion. Lipid-laden cells within the intima and closely associated with the developing lesion exhibit even greater acid phosphates and non-specific esterase activity.

On the basis of the plasmal, PAS, PFAS and peroxide (Dam) reactions it appears that certain intermediate stages in the oxidation of lipids, Schiff-positive groups are revealed which are intimately associated with "fatty streaks" and to a lesser degree with "fibrous plaques" seen in the arterial bed. Atheroma may in part represent products of oxidizing lipids which may not stain with conventional fat soluble dyes.

ÉTUDES HISTOCHIMIQUES SUR L'HYPERTENSION RÉNALE EXPÉRIMENTALE

A. PASQUALINO et G. H. BOURNE

Anatomy, Emory Iniversity, Atlanta, Georgia, U.S.A.

Lorsqu'on applique un anneau d'argent laminé sur l'artère rénale d'un rat, on engendre une hypertension persistante du type Goldblatt, même si l'on n'a pas extirpé le rein controlatéral (Wilson, C., et Byrom, F.B., *Lancet*, 1, 136, 1939; *Quart. J.Med.*, 34, 65, 1941). Nous avons démontré que dans le rein et dans les capsules surrénales des rats traités avec la méthode mentionnée l'on produit un changement dans l'activité de la phosphatase acide et alcaline, de la 5-nucléotidase et de la succino--déhydrogénase. (*Nature*, Vol. 182, 1426 – 1427, Nov. 22, 1958).

Maintenant nous avons fait une étude comparative entre des rats rendus hypertensifs avec l'anneau d'argent et des rats auxquels on a mis autour de l'artère rénale un anneau incompressible à large diamètre. Ces derniers animaux ne montrent pas d'altérations considérables ou bien significatives de la pression sanguine même au bout de 8 mois. Nous avons étudié la localisation et l'intensité de la réaction des enzymes mentionnés et aussi de ceux qui déphosphorylent plusieurs esters phosphoriques, de la cholinesterase et d'un second enzyme oxydatif, la cytochroméoxydase. L'activité de la phosphatase alcaline, de la 5-nucléotidase, de la phosphatase acide, de la succino-dehydrogénase et de la cytochroméoxydase était inférieure à la normale dans les reins des deux groupes, quoique plus remarquablement dans le groupe hypertensif. L'ATP-ase avait baissé dans les bordures en brosse des deux groupes, mais seulement dans le cytoplasme des cellules tubulaires du groupe hypertensif; les réactions de la thiamine phyrophosphatase, de la glucose-1 et de la glucose-6-phosphatase montraient un accroissement dans la bordure en brosse de la plupart des rats du groupe hypertensif et une tendence à décroître dans le groupe non hypertensif. La cholinestérase "vraie" montrait souvent un accroissement, mais parfois une diminution dans les glomérules des rats des deux groupes.

Dans les capsules surrénales des rats hypertensifs la phosphatase alcaline montrait parfois un accroissement, et parfois une diminution; dans

le groupe non hypertensif on notait toujours un léger accroissement. La 5-nucléotidase avait augmenté dans les deux groupes quoique plus remarquablement dans le groupe hypertensif. L'ATP-ase, la thiamine pyrophosphatase, la glucose-1 et la glucose-6-phosphatase avaient augmenté dans le groupe hypertensif, mais ils montraient rarement un changement dans le groupe non hypertensif.

Cette très intéressante constatation qu'un large annelet incompressif autour d'une artère rénale produit des changements histochimiques persistants non seulement dans les reins, mais aussi dans les capsules surrénales mérite d'être soulignée. C'est possible qu'aussi ce type d'annelets incompressifs peut produire une hypertension persistante, si l'on les tient en place pour un temps bien plus long.

Ce travail a été accompli à l'aide du grant G-58-4 par the Life Insurance Medical Research Fund, New York.

QUELQUES APPLICATIONS DE L'HISTOPHOTOMÉTRIE EN ANATOMIE PATHOLOGIQUE

R. LAUMONIER et R. LAQUERRIÈRE

Chaire d'Anatomie Pathologique, École de Médecine, Rouen

L'étude du taux nucléaire de l'acide desoxyribonucléique (A.D.N.) a particulièrement retenu notre attention. L'évaluation de ce corps a été réalisée sur coupes après inclusion à la paraffine, et réaction de Feulgen, et Rossenbek. La méthode histophotométrique quantitative a été menée avec l'appareil de Lison. Les résultats sont consignés sous forme d'histogrammes accompagnés de corrections statistiques courantes.

C'est tout spécialement au domaine de la pathologie digestive que s'adresse cette méthode, mais de nombreuses autres lésions tumorales ont été analysées ou sont en cours d'étude.

Deux grands types de lésions sont présentés:

– D'une part les tumeurs bénignes et malignes.

– D'autre part les altérations hépatiques non tumorales. Tous les échantillons proviennent de biopsies ou de pièces opératoires fixées immédiatement et techniquées dans des conditions strictement superposables.

I – *Les tissus tumoraux*

A – Tumeurs rectales: 150 tumeurs ont été analysées,
75 polyadénomes bénins,
68 épithéliomas,
7 tumeurs villeuses.

Les noyaux ont été choisis dans les tubes hyperplasiques et le taux d'A.D.N. de référence a été déduit de l'analyse du chorion (qui est identique, même au cours des inflammations, à celui de l'épithélium sain). En général, 100 noyaux ont été étudiés sur chaque pièce.

a) La charge moyenne en A.D.N. dans les *poly-adénomes* augmente de façon nette et constante. La valeur 2n est dépassée dans tous les cas, mais reste toujours inférieure à 4n.

b) Dans les épithéliomas, la charge moyenne est toujours supérieure à 4n; et l'histogramme ne suit plus une distribution normale.

c) Parmi les *tumeurs villeuses*, certaines se confondent avec les

polyadénomes. D'autres avec les épithéliomas. Ces résultats ont été contrôlés et valorisés par l'évolution clinique et même histologique après des reculs atteignant 3 ans.

B – Autres tumeurs:

La même discrimination reposant sur le rapport ADN Tumoral/ADN Témoin est réalisable avec des critères semblables, dans les domaines:

cutanés	 30	tumeurs
Mammaires	. . . 57	"
Urinaires	. . . 12	"
Cervico utérins	22	"

II – *Lésions non tumorales*

Les charges en A.D.N. ont été étudiées sur une centaine de ponction biopsies de foie humain. Les différents diagnostics histopathologiques comprenaient: cirrhoses alcooliques, stéatoses, hypertrophies, hémochromatoses, dénutrition et hépatites diverses (virales en particulier). Une centaine de noyaux a été étudiée sur chaque pièce.

Une première constatation se dégage de la confrontation anatomo clinique. Il n'y a pas de type d'histogramme particulier à chacune des maladies étudiées.

Une seconde notion est le manque de parallélisme entre le type histologique, l'intensité du tableau clinique et les perturbations biologiques fonctionnelles.

On ne peut donc faire le diagnostic précis par cette méthode.

Mais il est par contre intéressant de souligner un certain caractère des histogrammes lors d'une réparation du tissu hépatique. Des phénomènes d'endoploïdie se développent, amenant un étalement de l'histogramme vers des valeurs multiples de 2n, telles que 4 et 8 n. On peut tirer de cette constatation un argument pronostique certain, en particulier au cours de hépatites et des cirrhoses.

Ce phénomène est à rapprocher des variations de charges nucléaires en A.D.N. observées au cours des processus de réparation après hépatectomie.

THE EVOLUTION OF THE PROTEIN-POLYSACCHARIDE COMPOSITION OF CARDIAC CONNECTIVE TISSUE IN THE DEVELOPMENT OF RHEUMATIC PROCESS

G. V. ORLOVSKAYA

The State Institute of Rheumatism
of the Ministry of Health of the RSFSR, Moscow

The principal indices of the protein and polysaccharide composition of the normal connective tissue of cardiac valves and changed one during the development of rheumatic process were studied. The investigations were performed on the basis of the parallel hystochemical and biochemical analysis. Obtained data enabled to establish the composition of foci of pathological changes, determined as mucoid swelling, fibrinoid (fibrinoid swelling), fibrinoid necrosis, hyalinosis, sclerosis. The regularities of changes give ample basis to consider the referred types of pathological connective tissue as different stages of one and the same process of progressing disorganization of collagen fibers and the ground substance with the involvement of plasma components.

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES BINDEGEWEBS BEI EINIGEN PATHOLOGISCHEN VORGÄNGEN

A. J. STRUKOV

Lehrstuhl für pathologische Anatomie
I. Moskauer Sechenov Medizinische Institut, Moskau, S.S.S.R.

Das Bindegewebe stellt einen Komplex miteinander verbundener zellulärer und extrazellulärer Bestandelemente dar. Extrazelluläre Strukturen haben einen komplizierten chemischen Bestand und nach ihrem Bau können sowohl faserig als auch amorph sein. In der ganzen Reihe pathologischer Zustände beobachtet man eine Lokalesowie Systemdesorganisation intrazellulärer Komponente des Bindegewebs, die durch die mehr oder weniger nachweisbare zellulären Reaktionen begleitet wird. Es wurde Veränderungen der morphologischer und biochemischer Struktur des Grundteils des faserigen Eiweises des Bindegewebskollagens erforscht. Mit Hilfe des Ferments der Kollagenase und Hyaluronidase ist festzustellen gelungen, dass bei kollagenen Krankheiten, bei denen die fortscheitende Systemdesorganisation des Bindegewebs zu beobachten ist, auch die Verletzung der Verbindung von Prokollagen und die Darstellung von sauren Mukopolysacchariden nachgewiesen wird. Dabei wird auch das Bild der mukoider Schwellung festgestellt. Die Intensität dieses Vorgangs sowie der Charakter der zellulären Reaktionen sind verschieden, was die Ungleichheit der biochemischen Veränderungen von Kollagen bei den Kollagenen Krankheiten bezeigt. In einigen Fällen beobachtet man eine Anhäufung von Histozyten, die durch Ribonucleinsäure und Glykogen beladen sind (Rheumatismus) in anderen Fällen – eine Anhäufung von plasmatischen Zellen, und endlich kann man auch den Ausfall von Desoxyribonucleinsäure aus den zellulären Kernen und deren Erscheinen in freiem Zustand beobachten. Es wurde das Phänomen der fibrinoiden Veränderungen des Bindegewebs untersucht, und dabei wurde mit Hilfe histochemischer Methoden der unhomogenen Charakter des Baus der Fibrinoide gezeigt.

ON HISTOCHEMISTRY OF EXTRAEMBRIONIC CONNECTIVE TISSUE IN PATHOLOGICAL CONDITIONS

N. V. DONSKIHK, V. V. VINOGRADOV, M. Y. SUBBOTIN

Novosibirsk Medical Institute

I. Revealing the presence of acid mucopolysaccharides histochemically is one of the most valuable and demonstrative methods of the study of the pathology of the connective tissue of provisory organ showing early morphological changes which are detected with difficulty.

II. In nephropathy during pregnancy and in some inflammatory processés in the placenta an increase of the amount of acid mucopolysaccharides is seen in the connective tissue of the foetal part of the placenta. Very early and moreover, there are some changes in some fermentative systems.

III. The development of hydramnion is accompanied by rapid accumulation of highly polimeric acid mucopolysaccharides in the interstitial layer of the amnion, that is in the amniochorionic space.

IV. Such increase in the accumulation of highly polymeric acid mucopolysaccharides also takes place in Wharton jelly of the cord in various pathological conditions when there is a possibility for infection and toxins to pass from the mother to the foetus.

V. In pathological conditions the accumulation of great amount of acid mucopolysaccharides in the connective tissue of extraembryonic organs can be regarded as a manifestation of the general biological protective reaction of the foetus.

ÉTUDES SUR L'ORIGINE DE L'AMYLOIDE

H. E. CHRISTENSEN

Rheumatic Research Laboratory (C. Teilum), Copenhague

En conformité avec les idées de *Teilum* que la substance amyloïde est produite par une dysfonction cellulaire, nous avons étudié les réactions cellulaires dans l'amyloïdose expérimentale en employant des méthodes histochimiques.

Pendant la période de stimulation de souris au moyen d'injections souscutanées de caséine, le tissu réticulaire réagit par des proliférations cellulaires, qui montrent un contenu augmenté en acide ribonucléique cytoplasmique.

Les premières traces de l'amyloïde sont trouvées au niveau des proliférations et sont visibles comme des grains et des globules PAS-positifs dans le cytoplasme. Plus tard l'amyloïde sera située extracellulairement, en même temps que le contenu de l'acide ribonucléique baisse. Ces faits ressemblent beaucoup à une sécrétion de la substance par les cellules. Quand la substance augmente en quantité la métachromasie au Bleu de Toluidine devient de plus en plus forte, et en utilisant le Bleu Alcian et l'oxyde de fer colloïdal et aussi un traitement enzymatique, il fut démontré qu'un polysaccharide de la nature de l'héparine était apparu.

Les résultats obtenus confirment l'hypothèse que l'amyloïde a une origine cellulaire par dépôt au niveau de formation et qu'il n'est pas nécessaire de regarder comme dépôt de substances venant du sang subissant un changement initial et causal.

ENZYMORPHOLOGY OF ESTROGEN STIMULATED RAT VAGINA

M. HAYASHI and W. H. FISHMAN

Tufts University School of Medicine and the New England Center Hospital, Boston, Massachusetts

The β-glucuronidase activity of the secondary sex tissues of the female rodent is sensitive to the level of circulating estrogen. For purposes of defining the exact locus of this enzyme-hormone relation, our previous experiments (*Histochemical Society*, April 9, 1960) demonstrated that striking changes were evident as early as two hours following estrogen injection by the subcutaneous route. At this time, β-glucuronidase concentrated on the nuclei of cells of the vaginal stratum germinativum, esterase increased in the cytoplasm of cells in the germinal and intermediate layers of the epithelium, and alkaline phosphatase enriched the capillary endothelium. Alterations in acid phosphatase and DPNH--diaphorase took longer to appear.

In the present study, it has been possible to detect enzymorphologic change with regard to vaginal β-glucuronidase as early as 30 minutes following intravenous injection of estrogen. Thus, five weeks after ovariectomy, four–month old female Wistar rats received 2 to 10 γ/100 g body weight of estradiol injected into the femoral vein. They were sacrificed at intervals ranging from 5, 10, 30, to 480 minutes. The vagina was removed and fixed immediately in formal-chloral fixative. Next morning 2 mm thick portions of the tissue were washed well with water (1 hr), embedded in gelatin, and then returned to fresh fixative for another night. After washing out the fixative (0·5 to 1·0 hr.), 7 micron thick sections were cut on the freezing microtome for enzymorphology, and cellular sites of activity were demonstrated for β-glucuronidase and α-naphthyl esterase. The first remarkable enzyme change was the appearance of β-glucuronidase in the cytoplasm of the most superficial layer of vaginal cells which now were columnar in appearance. Moreover, the enzyme appeared to migrate towards the lumenal surface. Photomicrographs will illustrate this event and others observed later with α-naphthyl esterase. Feulgen counterstained preparations of these sections will also be presented and, where possible, electron microphotographs.

A MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE HUMAN JEJUNAL EPITHELIUM IN NON-TROPICAL SPRUE

HELEN A. PADYKULA. ELLIOTT W. STRAUSS, A. J. LADMAN, and F H. GARDNER

Departments of Anatomy and Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A

Intraluminal biopsy methods have correlated clinical findings in non-tropical sprue with a mucosa composed of short blunt villi and long dilated crypts (Shiner, 1956). Histochemical and electron microscopic studies were made on mucosal biopsies from 13 patients with sprue, 2 healthy physicians, and 26 hospitalized controls.

In normal epithelium, undifferentiated cells of the crypts (zone 1) acquire greater phosphatase, esterase, and succinic dehydrogenase activity as they differentiate into absorptive cells of the villi (zone 2). Cytoplasmic basophilia (ribonucleoprotein) diminishes progressively as the cells migrate toward the apex of the villus.

In sprue three zones can be recognized in jejunal epithelium by histochemical methods. The apparent crypt has a basal region composed principally of undifferentiated cells (zone 1) and an upper region of normal appearing absorptive cells (zone 2). Thus, the upper crypt in sprue corresponds histochemically to part of the villus in the normal. The surface epithelium (zone 3) is rich in cytoplasmic ribonucleoprotein but deficient in esterase, succinic dehydrogenase, and phosphatases. Absorptive cells frequently show ultrastructural abnormalities in mitochondria and microvilli. In sprue mitotic activity of the epithelium is elevated, mitoses occur on the villi, and crypts (zone 1) are lengthened two fold. These findings suggest disturbances in differentiation and rate of replacement of the epithelium.

Experimental comparison of triglyceride uptake *in vivo* by normal and abnormal villi demonstrates a lower rate of epithelial absorption in sprue.

ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES PHOSPHATASES PAR PONCTION-BIOPSIE DE FOIE CHEZ LES MALADES SOUFFRANT D'HÉPATITE ÉPIDÉMIQUE

M. GÜNDISCH, T. FESZT, G. KEMÉNY et S. ALMÁSI

Chaire d'histologie de l'Institut de Médecine et de Pharmacie.
Tîrgu-Mures, Roumanie

Nous avons étudié au point de vue histochimique la phosphatase alcaline et acide dans le tissu hépatique prélevé par ponction-biopsie aux malades souffrant de différentes hépatophathies hépatite épidémique aiguë, hépatite chronique, cirrhose, atrophie hépatique). En ce qui concerne la phosphatase alcaline, nous avons observé la croissance de l'activité dans les capillaires biliaires dans l'endothelium sinusoïdal et dans le tissu conjonctif néoformé. La localisation extracellulaire de l'activité phosphatasique alcaline à la périphérie des espaces portales, ou même à l'intérieur de lobule parmi les cordons cellulaires, constitue l'indice d'une fibrogenèse collagène, marquant en même temps la tendance de la maladie vers la sclerose ou la cirrhose. Au cours de l'hépatite aiguë et chronique l'activité phosphatasique acide augmente elle aussi. Au commencement de la nécrobiose, l'activité phosphatasique acide s'intensifie pour qu'elle disparaisse dans les cellules complètement nécrosées.

AN HISTOCHEMICAL COMPARISON OF ENZYMATIC CHANGES IN RATS MADE HYPERTENSIVE BY GOLDBLATT TECHNIQUE AND X-RAY EXPOSURE

R. MCKELVEY

Department of Anatomy, Emory University, Atlanta 22, Georgia, U.S.A.

The enzymatic changes in various tissues of rats made hypertensive with the Goldblatt technique were compared with hypertension induced by one 1,200 r exposure to X-rays localized upon both kidneys. Qualitative and semi-quantitative changes were noted in the distribution of: succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, alkaline phosphatase, adenosine monophosphatase (AMP), adenosine triphosphatase (ATP), glucose-1-phosphatase, glucose-6-phosphatase, and thiamine pyrophosphatase. Staining for total lipids and phospholipids was also done. Change in collagen and elastic fiber distribution was also determined. The tissues examined were: kidney, adrenal, liver, spleen, heart, abdominal aorta and renal artery.

LES MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES, HISTOCHIMIQUES ET SPÉCIALEMENT ENZYMATIQUES DANS LE PARENCHYME PULMONAIRE SURTOUT DANS LES VAISSEAUX APRÈS UNE IRRADIATION UNIQUE AUX RAYONS X DU POUMON DU LAPIN

J. ŠVEJDA, F. PAPOUŠEK, V. TOMÁŠEK, J. KOTAS

Nous avons suivi en dehors des changements dans les bronches et dans les alvéoles surtout les changements dans les petites artères, pour nous rendre compte de la cause de leur sclérose qui conduit vers la fibrose pulmonaire après irradiation. 16 lapins étaient irradiés avec une dose de 3150 r. Les préparations étaient traitées d'après une série de méthodes usuelles histochimiques, surtout pour les phosphatases alcalines et acides, ainsi que les estérases non-spécifiques par azoccouplage. Chez les lapins tués après 4 et 14 jours l'activité de la phosphatase alcaline était basse. La phosphatase acide et l'estérase nonspécifique généralement négatives dans les vaisseaux restaient négatives après 4 jours. Après 14 jours elles étaient positives seulement dans les fibroblastes et dans les histiocytes proliférants de la paroi vasculaire et de ses environs. Après 1 à 4 mois la phosphatase alcaline était bien positive, mais l'acide et l'estérase non-spécifique restaient négatives. Les fibres élastiques dans les artères étaient désintégrées ce qui peut être expliqué par l'atteinte de leurs mucopolysacharides acides, car cette réaction était négative. Les fibres de fibrine isolées dans quelques alvéoles ne se coloraient pas bien, peut être à cause du changement physico-chimique de la structure de leurs molécules. La fibrose avec calcification apparaissait dans quelques alvéoles après 4 mois et commençait déjà après 1 mois. La sclérose des petites artères produite par les dits changements est très probablement un des facteurs prépondérant de cette fibrose pulmonaire.

HISTOCHIMIE DANS LES RECHERCHES ONCOLOGIQUES

H. G. GODLEWSKI

Gliwice, Pologne

L'objet que je me propose d'étudier dans ce rapport concerne les problèmes oncologiques les plus importants de l'histochimie. Compte tenu du programme du Congrès, on a omis les problèmes concernant les acides nucléiques et les résultats des recherches portant sur les particules de fractionnement des cellules. En histochimie oncologique, on distingue d'une part les problèmes intéressant les cliniciens et les histopathologistes, et d'autre part ceux ayant trait à l'oncologie théorique ou bien expérimentale. Sur le plan des problèmes cliniques, ceux qui traitent des différences entre la cellule normale et la cellule cancéreuse se placent au premier plan. Il en va de même de l'histogénèse du cancer (problèmes traitant des transformations morphochimiques caractéristiques du processus de la dégénérescence maligne des cellules). Pour les problèmes de l'oncologie théorique, abstraction faite de ceux du micrométabolisme intracellulaire, l'histochimie démontre la réactivité des tissus cancéreux. Ces résultats expérimentaux expliquent la génèse des tumeurs.

Dans le domaine de la génèse des tumeurs, l'histochimie est englobée dans les recherches fondamentales des processus biologiques (processus trophiques, dégénérescence et régénération s'opérant au cours de la naissance et du développement des tumeurs). Pour illustrer les recherches histochimiques effectuées sur le matériel humain, et ceci en rapport avec les problèmes de la carcinogénèse, on a discuté des travaux portant sur l'évolution et la naissance du cancer du col utérin, et du cancer de la mamelle. La prolifération de l'épithelium du col utérin "paratypia maiorii gradus" et "epitheliosis" en mastopatia cystica mammae où se classe la notion histologique de stade précancéreux, a une certaine caractéristique histochimique.

Bien que les résultats des recherches histochimiques sur le stade précancéreux ne soient pas uniformes et diffèrent selon le matériel et le chercheur, on constate qu'ils témoignent d'une sorte d'inconstance métabolique de la part du tissu précancéreux. Ce phénomène n'est pas visible dans les tissus normaux et cancéreux. C'est ainsi que la glycogène qui

existe ou non (en quantité variable) dans le tissu atypique est nettement présent dans le tissu normal. Il manque dans le cancer envahissant.

De même les phosphatases alcalines ne montrent aucune réactivité dans le cancer de la mamelle tandis que leur activité est démontrée dans les cas de prolifération épithéliale (dans les canaux dilatés ou dans les cystes). Aux stades que l'on croit précancéreux, l'activité des phosphatases alcalines est très variable. Il en est de même pour d'autres substances. Elles fournissent la preuve de l'instabilité des transformations chimiques à ce stade. Nombre de travaux sur les tissus normaux et cancéreux ont un but clinique. Il résulte de la revue bibliographique qu'il n'existe pas de méthode histochimique sûre permettant de différencier les cellules cancéreuses et les cellules normales des cellules du stade précancéreux. On peut utiliser les réactions des phosphatases alcalines et quelquefois celles des amidopeptidases, des phosphorylases, ou la recherche du potassium. Néanmoins la méthode semi-histochimique qui consiste à colorer des coupes ou des frottis au moyen du complexe protéique à la fluorescéine semble la plus sûre.

Les cellules de la périphérie des tumeurs se caractérisent par une plus grande activité des protéinases que celles qui sont situées au centre. Ce phénomène est en rapport avec l'augmentation des groupements–SH liés aux protéines.

Les tumeurs différenciées (à prolifération moindre) manifestent pour la plupart une activité enzymatique réduite.

Au sujet du problème de l'infiltration du substrat au travers des cellules cancéreuses, on a discuté de la réaction du tissu conjonctif. Dans ce tissu on démontre qu'il y a des réactions positives aux mucopolysaccharides, aux phosphatases alcalines et aux amidopeptidases.

On a étudié, en cancérologie expérimentale les transformations des mucoprotéines dans le tissu conjonctif au cours de la prolifération de l'épiderme irrité par l'application de substances cancérigènes.

On étudie les variations de la réaction des phosphatases, des groupes –SH et des déshydrogénases au stade précancéreux dans le foie.

En rapport avec l'étiologie des cancers (des tumeurs) à virus, on a attiré l'attention sur les inclusions du noyau et du cytoplasme des cellules inoculées par ces virus. Elles se caractérisent par la présence de ribonucléoprotéines et de lipides.

Dans l'exemple du cancer transplantable du vagin de souris, si l'on applique des oestrogènes sur ces vagins, on voit une nette augmentation de l'activité des phosphatases alcalines dans les tissus sains, tandis qu'elle reste inchangée dans les tumeurs.

On a discuté les résultats des recherches histochimiques portant sur certains organes (foie, glande surrénale) qui sont le siège de grandes transformations morphochimiques chez le sujet atteint d'une tumeur.

On a étudié également la localisation des phosphatases dans les

cellules cancéreuses cultivées in vitro. On voit le rôle des membranes cellulaires dans l'activité enzymatique.

En conclusion, on a démontré l'importance des études histochimiques en oncologie tout en soulignant la nécessité de faire conjointement l'analyse chimique des tissus. Des recherches expérimentales mettent en évidence les particularités des tissus cancéreux, indémontrables par d'autres moyens.

HISTOCHEMISTRY OF ENZYMES IN TUMOURS AND ITS SIGNIFICANCE IN PATHOLOGY

R. G. J. WILLIGHAGEN

Section for Applied Histochemistry,
Laboratory of Pathology, University of Leiden, Netherlands

Experiences with methods for demonstrating enzymes in tissue sections applied on frozen sections of unfixed human tumour specimens are reported. At the present time in about 700 tumour specimens the activity of the hydrolytic enzymes alkaline and acid phosphatase has been investigated. In 350 of these specimens the activity and the localization of 5-nucleotidase, adenosine-tri-phosphatase, non-specific esterase and aminopeptidase has also been studied. On about 150 tumours methods for 5 different dehydrogenases were also applied.

Enzyme activities for each specific enzyme are found to be distributed among tumour cells of different types in a specific pattern. This enzyme pattern can be correlated with the type of tumour as well as in some cases with its grade of differentiation. Several tumours can be characterized by the activity of one or more enzymes. When using all the hydrolytic enzymes mentioned above, it is possible to characterize many human tumours on their enzyme patterns. Metastasis in general were found to possess the same enzyme pattern as the primary tumour.

Some examples of the results of the systematic application of histochemical enzyme methods in pathology will be discussed.

1) In the differential diagnosis of adenocarcinoma of the lung from other adenocarcinomas on the basis of the activity of alkaline phosphatase and aminopeptidase in their cells.

2) The use of aminopeptidase in the diagnosis of gastric carcinoma.

3) In the differential diagnosis of reticulumcellsarcoma and anaplastic carcinoma on the activity of acid phosphatase, non-specific esterase and adenosine-tri-phosphatase.

Enzyme methods were found useful as a criterion for tumour cell differentiation. Examples:

1) Decrease of acid phosphatase activity in anaplastic carcinoma of the colon, compared with well differentiated adenocarcinoma of this organ.

2) The alkaline phosphatase activity as an indication for the grade of differentiation of tumours of the connective tissue.

HISTOCHIMIE DE L'ARN DES TUMEURS MALIGNES

VENDRELY

Institut de Recherches sur le Cancer, Villejuif

Les résultats d'analyses biochimiques de l'ARN qui ont été faites sur un grand nombre de tissus cancéreux sont assez variables et montrent souvent une diminution de la teneur en ARN par rapport au tissu normal. Au contraire, les travaux histochimiques effectués soit par la méthode de microspectrophotometrie en ultraviolet (Caspersson) soit par la méthode de Brachet montrent constamment une augmentation de l'ARN de la cellule au cours de la cancérisation.

Les travaux de Caspersson et de ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence 2 types extrèmes de cellules dans les tumeurs malignes: les cellules A très riches en ARN et les cellules B dont le cytoplasme est très pauvre en ARN. Ces deux types de cellules ainsi que des types intermédiaires sont représentés en proportions variables suivant les types des tumeurs. Les cellules A riches en ARN représentent des cellules tumorales placées dans de bonnes conditions de nutrition et marquent une tendance nette à l'extension alors que les cellules B sont situées dans les parties mal irriguées de la tumeur et sont vouées à la nécrose.

L'analyse chimique, qui s'adresse à des masses tumorales représentant un mélange de telles cellules ne peut donc donner qu'une valeur moyenne de leur teneur en ARN. L'histochimie permet ici une meilleure compréhension du phénomène elle a permis également à certains auteurs d'étudier le cycle des modifications du contenu en ARN des cellules au cours de la production de tumeurs expérimentales.

On a en outre appliqué récemment des méthodes d'histochimie quantitatives de l'ARN à de nombreux frottis de cellules présumées concéreuses. Le résultat de ces travaux semble indiquer que ces méthodes pourraient donner plus de précision au cytodiagnostic des tumeurs.

LES MODIFICATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE TISSULAIRE SOUS L'EFFET DE CERTAINES SUBSTANCES CYTOSTATIQUES

M. GÜNDISCH, T. FESZT, G. KEMÉNY, Cs. HADNAGY

Chaire d'Histologie de l'Institut de Médecine et de Pharmacie
de Tîrgu-Mures, Roumanie

Les auteurs ont étudié l'activité enzymatique tissulaire des phosphatases alcalines et acides, dans le foie, le rein, la rate, le duodénum, et la surrénale des cobayes et des rats traités avec des substances cytostatiques, certaines de celles-ci employées aussi dans la thérapeutique des tumeurs.

La sarcomycine, l'actinomycine et la cholchicine ont diminué la phosphatase alcaline. La téroptérine, l'aminoptérine, la sanamycine, l'uréthane, la colchicine et le degranol ont inhibé l'activité de la phosphatase acide tissulaire. La chinonediethylamine (Bayer E 39), en dose de 1–3 mg ne modifie pas l'activité phosphatasique alcaline et acide tissulaire des cobayes et des rats.

Les recherches effectuées prouvent qu'on ne peut que partiellement expliquer l'activité cytostatique des ces substances par leur action sur les phosphatases tissulaires.

CYTOLOGICAL CHANGES IN EHRLICH ASCITES TUMOR CELLS TREATED WITH ANTISERUM

A. LINDNER

Department of Pathology Veterans Administration Hospital
and University of Buffalo School of Medicine, Buffalo, New York

We believe that the action of antiserum on Ehrlich ascites tumor cells is possibly due to an immunological reaction between the RNA-protein of the cytoplasm and antibodies at the cell surface causing cytolysis of these cells.

APPLICATION DES TECHNIQUES CYTOCHIMIQUES À L'ÉTUDE DE L'INTERACTION VIRUS-CELLULE

V. DEFENDI

The Wistar Institute Philadelphia, Pa.

Diverses techniques cytochimiques peuvent fournir des informations sur la nature des lésions cellulaires produites par un virus, sur les modalités de sa multiplication et, dans certains cas, sur sa constiution chimique. Les recherches que nous allons rapporter sont consacrées à une étude de ce type. Un agent du type adénovirus de la poule (GAL) produit des inclusions intranucléaires spécifiques soit dans les cultures de tissu hépatique d'embryon de poulet soit dans les foies embryonnaires eux-mêmes. La réaction de Feulgen colore fortement ces inclusions et met en évidence un important accroissement de l'ADN des noyaux infectés. Ces inclusions donnent aussi des réponses fortement positives avec le réactif de Schiff à la ninhydrine et les sels de tétrazonium; en revanche elles ne se colorent que faiblement par la réaction spécifique des protéines du type histone. En utilisant la thymidine tritiée on a montré que l'ADN des chromosomes ne participe pas directement à la formation des inclusions et que l'ADN de ces inclusions est synthétisé *de novo* sous l'influence du virus. La microscopie électronique a montré que les particules virales ont une organisation en réseau et sont situées à l'intérieur des corps d'inclusion. Un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, la 5-fluorodéoxyuridine, diminue considérablement la taille des inclusions, l'intensité de leur coloration ainsi que la production des unités infectieuses virales.

En conclusion, l'utilisation combinée de diverses techniques histochimiques permet d'aboutir aux conclusions suivantes en ce qui concerne l'interaction cellule-virus:

1. Le virus provoque un important accroissement de l'ADN des noyaux des cellules infectées.

2. L'ADN des inclusions intranucléaires est synthétisé *de novo* et cette synthèse évolue pendant plusieurs heures jusqu'à la rupture cellulaire.

3. Cet ADN néoformé n'est pas associé à des protéines de type histone.

4. Ce virus est très probablement un virus-ADN.

HISTOCHEMICAL STUDY OF THE CONNECTIVE-TISSUE CHANGES OBSERVED IN THE COURSE OF DEVELOPMENT OF INDUCED SARCOMAS IN RATS

JU. M. VASILIEV

Institute of experimental and clinical oncology, Moscow

The changes in the subcutaneous connective tissue of rats after implantation of pellets containing carcinogenic hydrocarbons were studied. Sections and spreads of the connective tissue surrounding these pellets were prepared. More than 20 various morphological and histochemical methods were used, among them reactions for nucleic acids, for proteins, for lipides, for different enzymes, supravital staining with neutral red and supravital fluorescent-microscopic examination, method for demonstration of labile components of intercellular substance developed by author, etc.

It was shown, that carcinogenic hydrocarbons cause several types of early pathological changes in the connective tissue: a) distortion of the process of fibroblast's differentiation which is manifested by the changes in the shape and in histochemical characteristics of these cells; b) accumulation of lipides in the cytoplasm of connective tissue cells; c) distortion of the process of collagen synthesis, and, especially, dissociation of the formation of chromotropic muco polysaccharide (probably, hyaluronic acid), of PAS-positive glycoprotein and of other collagen-fibre components.

These changes were observed only in experiments with active carcinogenic hydrocarbons (9, 10-dimetnyl-1, 2-benzanthracene and 20-methylcholanthrene); they were not seen in control experiments with pellets containing only the pure solvent (paraffin) or inactive and weakly active hydrocarbons (anthracene or 1, 2-benzanthracene). Possible mechanisms of development of the observed connective-tissue changes and their role in the genesis of induced sarcomas will be discussed.

A HISTOCHEMICAL STUDY OF OXIDATIVE ENZYMES IN CARCINOMA OF THE LARGE INTESTINE IN MAN

L. W. WATTENBERG

Department of Pathology, University of Minnesota Medical School,
Minneapolis, Minnesota, U. S. A.

A histochemical study of three oxidative enzymes, DPNH diaphorase, TPNH diaphorase and succinic dehydrogenase in normal mucosa, benign adenomatous polyps, and carcinoma of the large bowel in man will be presented. A reaction pattern distinct from that found in normal mucosa or benign adenomatous polyps has been observed in carcinoma. This pattern is characterized by high DPNH diaphorase and TPNH diaphorase activities and by a low succinie dehydrogenase activity as demonstrated by the tetrazolium salt reduction techniques employed. This distinctive reaction pattern is not present in all components of these malignant neoplasms. It is most consistently observed in the cells at the invading margin of the tumor, at the periphery of tumor cell aggregates and in isolated cell groups. One aspect of this pattern, the low succinic dehydrogenase activity, occurs in both benign and malignant proliferative processes of the large bowel mucosa.

DIE HISTOCHEMISCHE DIFFERENZIERUNG DER CARCINOME AUF GRUND DER STROMAREAKTION

H. SCHMIDT-MATTHIESEN

Universitäts Frauenklinik Göttingen, Allemagne

Beim endophytisch wachsenden Collumcarcinom sind die vordringenden Carcinomeinheiten bei bestimmter Schnitt-Technik von der Invasionsspitze bis zur Basis linear zu verfolgen. Die Wechselwirkungen zwischen Carcinom und Bindegewebe sind so histochemisch vom Anfang der Invasion an bis zur Ausbildung bindegewebiger Spätreaktionen zu verfolgen.

Im Invasionsgebiet herrschen lytische Vorgänge vor; primär an der interfibrillären Grundsubstanz (Lösung der MPS-Eiweiss-Assoziation, Desaggregation, Depolymerisation), sekundär auch am Fibrillengerüst. Histochemische Veränderungen sind häufig schon ausgeprägt, bevor morphologische sichtbar werden. Durch Kombination morphologischer und histochemischer Methoden lassen sich verschiedene Invasionsmechanismen nachweisen (Übersicht).

Die Initialvorgänge im Invasionsgebiet leiten komplexe Reaktionen am angrenzenden Bindegewebe ein, die sich aber nicht im Invasionsgebiet selbst, sondern erst dahinter manifestieren. Es lässt sich eine progressiv-destruktive (bis zum Endabbau der MPS gehende) und eine produktive (bis zur Bildung von Sulfo-MPS und Fibrillen laufende) Reaktion nachweisen. Ein dritter Typ ist durch überwiegende Umbauvorgänge an der Grundsubstanz und Umlagerung der Bindegewebsstrukturen charakterisiert.

Primäre Konstellation im Invasionsgebiet, sekundäre Spätreaktion des Bindegewebes und formale Wechselwirkungen kennzeichnen den Einzelfall. Durch die MPS-Histochemie, die Stroma-Fermenthistochemie (ATP-ase, 5-Nucleotidase, alk. Phosphatase) und morphologische Kriterien lässt sich eine eindeutige Differenzierung der verschiedenen Carcinomtypen durchführen.

Die genannte Differenzierung der Carcinome ist u. a. von klinisch-prognostischer Bedeutung.

THE HISTOCHEMISTRY OF RESPIRATORY ENZYMES IN CARCINOGENESIS

J. CHAYEN, A. A. SILCOX, E. K. AVES and A. L. E. BARRON

Department of Pathology, Royal College of Surgeons,
Lincoln's Inn Fields, London

In experimental liver carcinogenesis, gross biochemical estimation would suggest a seccessive loss of succinic dehydrogenase activity per unit weight of tissue. Whether such changes are due to effects within the parenchyma cells or are due to proliferation of cells of other origin which normally have a low dehydrogenase activity, can be demonstrated only by histochemical investigations. Such a study will be reported; the tissue is prepared by controlled temperature freeze-sectioning and endogenous respiration, endogenous and total succinic dehydrogenase are compared. The significance of histochemically demonstrable differences in respiratory enzymes of bile duct and parenchyma cells will be considered in relation to carcinogenesis.

In fully formed tumours the enzymic activity in different regions varies. To test the activity of respiratory enzymes in active tumour material, recourse has been made to secondary growths of liver cells in lung.

CYTOCHEMICAL STUDY OF ESTERASE ACTIVITY OF HUMAN NEOPLASMS AND STROMAL MACROPHAGES

B. MONIS and T. WEINBERG

Department of Pathology, Sinai Hospital, Baltimore, Maryland

This report deals with a cytochemical study of esterase activity of human neoplastic cells and of stromal macrophages. The esterase activity of tumor cells was found to be frequently high. Malignant epithelial cells stained usually intensely, whereas sarcomas and allied processes showed low or no activity. The product of esterase activity appeared located in some cell membranes and in granular or spheroidal bodies showing in some cases particular intracellular distribution, though no definite organelle structures could be identified. Macrophages showed various degrees of reaction, highest esterase activity being shown in the mature macrophage which contains metabolic products such as hemosiderin. Because of the content of esterase it is suggested that various stages of macrophage development could be traced and indirect evidence obtained of disintegration of macrophage *in situ*. Studies with various chemicals with inhibitory effect on esterases suggest that esterases shown in this study are of the non-specific type (aliesterases). A comparison of various naphthol esters of acetic acid (α naphthyl acetate, β naphtyl acetate and naphthol AS acetate) and 5 Bromoindoxyl acetate indicates the resemblance of results when different methods are used.

Sixty-two malignant and eleven benign tumors were studied. Formalin-fixed tissue, frozen sections and naphthol AS acetate and diazotized 4-*o*-tolylazo-*o*-toluidine (Fast Garnet Salt GBC new) was the main procedure used in this study.

RECHERCHE HISTOCHIMIQUE DU CANCER INDUIT DE LA PEAU

L. K. CHARACHIDZÉ

Laboratoire de pathomorphologie et d'histochimie
de l'Institut de chirurgie et d'hématologie expérimentale
et clinique de l'Académie des sciences de SSR Géorgienne, Tbilissi

On a étudié les composants protéiques, les glucides et les lipides du métabolisme des tissus de la peau des souris blanches au cours de la naissance et du développement du cancer de la peau induit au moyen de 9,10-diméthyle-1,2-benzanthracen.

Au début de la cancérogénèse dans la peau des souris blanches on remarque un abaissement de *pH* du point isoélectrique RNP et une diminution de leur contenu. Simultanément diminue le contenu SH des groupes albuminoïdes et il y a un renforcement de la réaction tétrazonique, indiquant l'augmentation des albuminoïdes contenant des amino-acides de tryptophane de tyrosine et d'histidine.

Au début des procès hyperplastiques et surtout dans la période de la croissance de la papillomatose dans les cellules de l'épiderme le contenu RNP, des groupes SH et des polysacharides du type glycogène augmente. En même temps a lieu la diminution de l'intensité de la réaction tétrazone.

Dès l'augmentation de l'infiltrat on définit d'une manière histochimique trois types principaux des cellules épitéliales, celles manifestant une disposition pour une multiplication ultérieure et pour une croissance par infiltration, celles entrant dans la voie de kératinisation et celles s'exposant à la nécrose. Les cellules du premier type sont caractérisées par un haut contenu RNP, DNP et des groupes SH. Dans les cellules du second type on remarque un brusque abaissement des nucléoprotéides, un renforcement de la réaction tetrazone et l'augmentation des groupes SH et SS. Dans les cellules du troisième type, on note l'abaissement graduel de tous les principaux composants chimiques.

THE HISTOCHEMISTRY OF SKIN AND CUTANEOUS GLANDS

W. MONTAGNA and R. A. ELLIS

Arnold Biological Laboratory, Brown University, Providence, Rhode Island

Skin being an active, heterogeneous, and complex organ system is an ideal tissue for the application of many histochemical studies. Since it is not possible within the limits of this paper to cover adequately all of the histochemical attributes of skin, the authors confine themselves to a report of the distribution of some of the enzymes. The authors will discuss the disribution of succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, monoamine oxidase, β-glucuronidase, phosphorylases, phosphatases, esterases, aminopeptidase, etc. in the skin of man. They will compare the results obtained in the skin of man with those they have obtained in the skin of other mammals, and particularly in the skin of other primates. There exist enormous species differences in the reactivity of skin to the various techniques used, and histochemical methods are becoming important tools in the study of phylogeny and anthropology as well as anatomy and physiology. To illustrate the systematic application of histochemistry to a single organ system and its usefulness in the study of anthropology, the authors present a study of the eccrine and apocrine sweat glands in man and in other mammals. From these studies emerges a trend which seems to trace the possible evolutionary pathways of the types of sweat glands in man.

HISTOCHEMISTRY OF THE SKIN OF THE GORILLA (*GORILLA GORILLA*)

R. A. ELLIS and W. MONTAGNA

Arnold Biological Laboratory, Brown University,
Providence 12, Rhode Island

ENZYMORPHOLOGY OF ESTROGEN STIMULATED RAT VAGINA

M. HAYASHI and W. H. FISHMAN

Tufts University School of Medicine and the New England, Center Hospital, Boston, Massachusetts, U. S. A.

1. β-Glucuronidase activity in the vaginal epithelium of rat, as visualized by enzymorphologic technique, was altered as early as 5 minutes after intravenous injection of estradiol-17β (10γ per 100 g body weight).

2. The earliest change in activity of the germinal layer was the appearance of a positive β-glucuronidase reaction in the nucleus, which was observed 5 minutes after injection. This phenomenon was followed by the appearance of β-glucuronidase in the cytoplasm of the most superficial layer of the vaginal cells which were now columnar in appearance. Moreover, the enzyme appeared to migrate towards the lumenal surface. This same effect was observed after intravaginal application of estrogen.

3. Two sites of the early action of estrogen therefore are the nuclei of cells of the stratum germinativum and the cytoplasm of cells of the superficial layer of the rat vagina.

L'ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES ÉPIDERMATOSES RÉACTIONNELLES

M. ITÔ

Aomori, Japon

Je veux donner mon opinion sur la pathogénèse de dermatoses épidermiques réactionnelles par voie externe au point de vue histologique et histochimique. Nous avons examiné, dans des dermites spontanées ou provoquées, des lésions toujours plus jeunes et y avons associé quelques expérimentations sur des animaux. Les manifestations de la dermite par contact sont variables et les lésions provenant d'un même allergène peuvent être soit une eczématisation ou soit une lichénification.

Notre examen histologique nous permet d'affirmer que c'est l'épiderme qui joue un rôle important dans la manifestation de l'acanthose des dermatoses réactionnelles: névrodermite et eczéma chronique. Mais nous pouvons découvrir aussi dans l'eczéma aigu une certaine acanthose plus ou moins reconnaissable dans la juxtaposition de spongiose. Nous avons trouvé histochimiquement dans le foyer d'acanthose l'augmentation de l'acide ribonucléique nucléo-cytoplasmique et l'apparition de glycogène et puis une activité plus forte de phosphorylase que dans la peau saine. Il nous semble pourtant que l'intense métabolisme de l'acide nucléique des cellules malpighiennes démontrerait assez la lésion primordiale dans la pathogénie de ces dermatoses et que le glycogène intra-épidermique serait lié à une nucléo-protéin . De ces observations nous pouvons déduire que la lichénification et l'eczématisation ne résultent que de l'action épidermique. Par contre, dans nos expérimentations humaines par des applications épicutanées d'acide trichloroacétique, d'onguent vésicant ou de neige carbonique, comme témoin, nous n'avons observé histochimiquement dans les cellules malpighiennes ni augmentation d'acide ribonucléique, ni apparition de glycogène et l'activité faible de phosphorylase. Ces aspects histochimiques sont différents d'avec ceux dans réactions allergiques susdites.

CONTRIBUTION
À L'HISTOCHIMIE DU PSORIASIS

O. BRAUN-FALCO

Hautklinik der Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Les altérations cutanées histologiques du Psoriasis sont caractérisées par une épidermogènese augmentée (Acanthose), par des altérations de la kératinisation (Hyperet Parakératose) et par une inflammation dans les zônes superficielles du chorion. Il n'est pas clair, si le Psoriasis est avant tout une maladie épidermique avec inflammation réactive ou d'abord une maladie inflammatoire avec lésions épidermiques consécutives. À cette question, quelques observations histochimiques donnent une réponse. Nous avons étudié la topochimie des substances inorganiques, des polysaccharides, des mucopolysaccharides, des lipoides, des acides aminés, des sulfhydryles et disulfures liés à des protéines et des enzymes dans l'épiderme psoriasique. Une attention spéciale a été accordée à l'histochimie de ces substances et des enzymes dans les couches cornées parakératosiques. Par l'examen comparatif avec de la peau normale on note une similarité extraordinaire de la couche cornée parakératotique du psoriasis et de la barrière, c'est à dire la couche de transition subcornéale dans la peau normale, où commence la kératinisation totale. Les résultats obtenus dans les couches cornées psoriasiques montrent, que probablement à cause d'une épidermogénèse très accentuée, la kératinisation évolue relativement lentement, c'est pourquoi les substances et les enzymes examinées, présentes normalement seulement dans la barrière, restent démontrables dans la couche cornée psoriasique.

À noter la richesse des mucopolysaccharides neutres et acides dans les couches cornées psoriasiques, qui sont présents dans l'épiderme normal, exclusivement dans les espaces intercellulaires de la couche de Malpighi. Les altérations du derme sont discutées. Pendant un traitement avec le Triamcinolone, nous avons observé des effets dramatiques des altérations épidermiques du Psoriasis. Un des premiers signes d'une normalisation est la reconstitution immédiate de la barrière subcornéale. Ces effets du Triamcinolone font admettre une action épidermotropique spéciale de cette substance dans le psoriasis. Trancher définitivement si le Psoriasis est d'origine épidermique, n'est pas possible pour le moment.

SOME CONTRIBUTIONS OF FLUORESCENCE MICROSCOPY TO THE HISTOCHEMISTRY OF THE SKIN

A. JARRETT

Reader in Dermatological Histology, U.C.H. Medical School,
Dermatology Dept. University College Hospital Medical School, London

Thioflavine T

Because it combines with nuclear proteins thioflavine T can be employed for their localisation in tissues. On excitation with filtered ultra-violet irradiation the nuclear proteins fluoresce a bright yellow. After incubating histological sections with either ribonuclease or desoxyribonuclease the remaining nucleic acid can be accurately located. Attempts have been made to measure the intensity of the induced yellow fluorescence by photometry and other methods. By estimating the light intensity before and after enzyme digestion a value for the RNA/DNA ratio can be calculated. Our investigations with this histochemical method for the determination of the RNA/DNA ratio are briefly described.

Congo red thioflavine T

The value of congo red and thioflavine T for the differentiation of skin keratins by differential colour fluorescence will be described together with illustrations of some experimental changes induced by vitamin A and triamcinolone on epidermal keratin.

Titan yellow

In addition the use of fluorescence microscopy and the fluorochrome titan yellow for the detection of magnesium in animal epidermis will be reported.

HISTOCHIMIE DE LA LANGUE HUMAINE

M. T. RAKHAWY

Département d'Anatomie, Emory University, Atlanta 22, Georgie, É.U.A.

La présence d'une série d'enzymes (phosphatases, estérases simples, succino-déhydrogénase, ácetylcholinésterase et butyrylcholinestérase) a été démontrée dans différents tissus de la langue chez l'homme.

Les phosphatases sont concentrées surtout dans l'épithélium autour des papilles gustatives, en particulier dans les pores. Elles peuvent être groupées en deux catégories: dans la première catégorie, la réaction caractéristique des phosphatases est limitée à l'épithélium de la région des papilles gustatives et paraît associée aux membranes cellulaires ou à la substance intercellulaire autour des pores gustatifs. Dans la seconde catégorie, la réaction est positive dans les cellules basales de tout l'épithélium de la langue, en plus d'une forte réaction dans les couches superficielles de l'épithélium dans la région des papilles gustatives. Dans cette région, toute l'épaisseur de l'épithélium donne une réaction positive, bien que la coloration soit plus marquée dans les couches basales. Les papilles gustatives elles-mêmes n'ont jamais de réaction positive.

Il est curieux de noter que les muscles de la langue ont donné une réaction négative pour la plupart des substrats, y compris l'acétylphosphate. Cette dernière observation offre un intérêt particulier parce que le muscle squeletique de l'homme contient une acétylphosphatase. Les nerfs ont donné une réaction positive dans le réseau de neurokératine. Les ganglions autonomes ont donné une réaction positive particulièrement forte dans les boutons terminaux. On a trouvé des estérases simples dans l'épithélium aussi bien autour des papilles gustatives qu'ailleurs. Une acétylcholinestérase a été reconnue dans les papilles gustatives, les plexus subépithéliaux, les ganglions nerveux, les terminaisons nerveuses, les fibres postganglionnaires qui innervent les éléments séreux et muqueux, dans les fibres des parois des vaisseaux sanguins, enfin dans les plaques motrices et les attaches musculo-faciales.

Une butyrylcholinestérase a été identifiée dans presque tous les tissus énumérés ci-dessus sauf dans les fibres nerveuses des glandes. La réaction devient moins intense dans les papilles gustatives et au niveau de la jonction musculo-faciale.

SOME MECHANISMS CONTROLING THE CHEMICAL ACTIVITY OF THE NEURON MITOCHONDRIA

V. V. PORTUGALOV

Laboratory of histochemistry of the Institute
of Brain Research Academy of Medical Sciences of the U.S.S.R., Moscow

The increase of the function of the nervous cell is accompanied by visible changes in the mitochondria. When the enzyme activity of dehydrogenases and oxidases is histochemically revealed these changes are manifested by an increase in size of intramitochondrial deposits of coloured reaction products. Such observations have been obtained in experiments with the irritation of the nervous structures by electric currents, with epileptiform attacks, arising under strong sound irritation and so on. In experiments with the excitation of the brain cortex by irritating the sciatic nerves by electric current, these mitochondrial changes were most demonstrative. Such changes are reversible and are not revealed after stopping the irritation. Mitochondrial alteration of the excited neurons show that enzymatic activity is changed in such cells, however, these alterations cannot be regarded as characteristic for increased enzymatic activity. It was found with the aid spectrophotometric methods that the activity of oxidative enzymes was, in fact, not increased but decreased in conditions of our experiments. When chemically determining the SH-groups in soluble proteins and nonprotein thiol compounds of the cortex tissue it had been shown that the excitation is accompanied by a sharp rise of the titrable SH-groups. The incubation of sections of normal and pathologically changed nervous tissue (ischemia, toxemia etc.) in the media of various ion and amino acid composition invariably lead to the change of physical and chemical properties of the protein-lipoid frame of mitochondrial and that of the activity of localized in them enzymes. It may be suggested that thiol groups play significant role in the permeability of the mitochondria frame and in controlling the activity of intramitochondrial enzyme systems.

LES CHOLINÉSTERASES
DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

M. A. GEREBTZOFF

L'auteur envisage d'abord la répartition générale de l'acétylcholinestérase et de la cholinestérase non spécifique dans ce système. La détection du premier enzyme révèle des modifications importantes au cours du développement embryonnaire: une augmentation d'activité, et une tendence à la concentration au niveau des synapses. Chez l'adulte, l'image histochimique peut présenter une grande variété suivant le type de synapse. Il faut envisager encore la possibilité d'une alternance de synapses "cholinergiques" et "non cholinergiques" et, en tout cas, celle d'une convergence de fibres "cholinergiques" et "non cholinergiques" sur le même neurone. Quant à la cholinestérase non spécifique, sa localisation ne subit pas de modifications aussi profondes au cours du développement, et on la retrouve, chez l'adulte, au niveau des gaines de myéline et du tissu glial.

L'auteur étudie ensuite la répartition systématique de l'acétylcholinestérase dans la moelle épinière et dans l'encéphale. Il insiste sur l'activité élevée de cet enzyme dans les formations qui interviennent, de façon directe ou indirecte, dans la régulation du comportement.

THE NUCLEIC ACIDS OF THE NERVE CELL'S NUCLEUS AND CYTOPLASM

W. JA. BRODSKY

Institute of Animal Morphology, Academy of Sciences of USSR, Moscow

The investigation of the various nerve cells (UV and visible cytophotometry, Feulgen's reaction, fast green staining) results to the next conclusions: 1) The general trend of cytoplasmic RNA functional changes are similar in the neurons of various types and phylogenetical levels (insects, amphibians, mammals). 2) The nucleus of some neurons fulfils a part of the synthetic functions which usually carried out cytoplasm. The nuclear RNA changes periodically. That's the conclusion there are 2 forms of RNA. 3) There is the correlation between the quantities and changes of RNA and proteins in the nerve cells. 4) There are no changes of DNA in the intensive synthesis of the neuron's RNA (quantitative data). 5) There is increase of the nucleolar surface in the RNA synthesis. 6) The increase of RNA content take place only by intact circulatory system (the comparison was done of RNA changes by light stimulation of a normal frog, of diplacin treated frog and of isolate retina). 7) There is the change of ribonucleoprotein state in the RNA synthesis: the number of free phosphorus groups.

HISTOCHEMISTRY AND MORPHOLOGY OF NORMAL AND INJURIED NERVES

B. B. FUCKS

Laboratory of histochemistry, Department of experimental biology and pathology, Institute of experimental biology and medicine of the Academy of sciences of the USSR

A HISTOCHEMICAL STUDY OF OXYDATIVE ENZYMES IN MYELINATING CULTURES OF CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS TISSUE

T. YONEZAWA, M. B. BORNSTEIN, E. R. PETERSON
and M. R. MURRAY

Laboratory for Cell Physiology, Columbia University,
College of Physicians and Surgeons, New York

HISTOCHEMISTRY OF DEMYELINATION

C. W. M. ADAMS and N. A. TUQAN

Guy's Hospital, London

Chemical changes in the myelin lipids cannot be detected during the early phases of Wallerian degeneration (Rossiter). This is confirmed by histochemical studies which show that the Marchi reaction does not become positive until the stage of chemical degradation of the myelin lipids. In the early phase of demyelination (first week) the sheath breaks down into small lipid particles (Nobak) but the histochemical and biochemical characteristics of these particles remain normal. For this reason attention has been directed to the proteins in demyelination. Myelin contains both *trypsin-resistant* and *trypsin-digestible* proteins. It was found that the *trypsin-resistant* protein of normal CNS myelin is a chloroform-soluble proteolipid while that in PNS myelin is insoluble in chloroform (TRPR, neurokeratin). However, no histochemical or biochemical changes were detected in these *trypsin-resistant* proteins or their attached lipids during demyelination. On the other hand, removal of the *trypsin-digestible* protein by proteolytic enzymes releases lipid from myelin in cryostat-cut tissues (Wolman). Investigation in vivo revealed that proteolytic activity increases in the early stages of demyelination but more as a result of liberation of enzyme pre-existing in the normal nerve than as a result of increased synthesis of enzyme. It is inferred that the release of lipid by the digestion of protein is an important factor in the early phase of demyelination.

RÔLE DU SYSTÈME NERVEUX DANS LE MÉTABOLISME DES MUCOPOLYSACCHARIDES

M. D. GEDEVANI

Institut de Chirurgie et d'Hématologie expérimentale et clinique
de l'Académie des Sciences de Géorgie, Tbilissi, URSS

Les expériences effectuées sur différents animaux (chats et grenouilles) montrent une modification de la distribution des mucopolysaccharides par excitation nerveuse après coloration au bleu de toluidine, à l'alcian bleu, après coloration d'après la méthode de Chabadache, et au carmin de Best.

L'influence exercée par le système nerveux sur les mucopolysaccharides peut être observée:

a) dans la peau et les glandes dermiques des grenouilles, sous l'effet de l'excitation électrique de la chaîne sympathique;

b) dans les glandes gastriques du chat sous l'effet de l'excitation électrique du nerf vague et du nerf sympathique.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES CELLULES VISUELLES DE LA RÉTINE DU POULET

R. O'RAHILLY et D. B. MEYER

Laboratoire d'Anatomie, Wayne State University, Detroit, Michigan

OBSERVATIONS À LA MICROSCOPIE INTERFÉRENTIELLE ET À L'HISTOCHIMIE SUR LE RÉSEAU CYTOPLASMATIQUE DES CELLULES NERVEUSES DE QUELQUES MAMMIFÈRES

G. B. DAVID et A. W. BROWN

Du Medical Research Council Neuropsychiatric Research Unit, M.R.C. Laboratories, Woodmansterne Road, Carshalton, Surrey, Angleterre

Les cellules nerveuses du système nerveux central de quelques mammifères, isolées par la micro-dissection et montées dans des solutions inertes contenant des sels et des protéines furent examinées encore vivantes sous le microscope interférentiel. Un réseau cytoplasmatique continu et de grande complexité y fût observé. Ce réseau est composé de trois espèces d'objets: grumeaux irréguliers, aux bords indistincts, jusqu'à 3 μ de diamètre; filaments assez tortueux et plus fins que 0,5 μ; espaces platanomorphes, d'environ 1×4 μ. Les grumeaux et les filaments sont optiquement bien plus denses que le cytoplasma de fond, tandis que les espaces ont une densité peu élevée. Le poids sec moyen d'un seul grumeau, estimé par la réfractométrie interférentielle, est de $1{,}92 \times 10^{-12}$g. Parmi les méthodes survitales, seule la microscopie interférentielle est capable de résoudre avec clarté le réseau cytoplasmatique; cependant, des images moins nettes peuvent être obtenues par la microscopie à contraste de phase dans des conditions favorables (*i.e.*, milieu d'immersion au μ_e = 1,398, anneau de phase n'absorbant que 45% des rayons directs et les avançant par $\lambda/4$), et par la micrographie aux rayons ultra-violets de 257 mμ. Les réactions histochimiques démontrèrent que les grumeaux et les filaments contiennent de L'ARN, des protéines basiques et des phospholipides fortement masqués. Les espaces platanomorphes ne donnèrent que des résultats négatifs à toutes les réactions histochimiques essayées. Il a été possible de démontrer que, dans les cellules nerveuses des vertébrés, le réseau cytoplasmatique mis en évidence par la microscopie interférentielle, les objets colorés par les méthodes de Nissl, et ceux argentés ou osmiés par les méthodes de Golgi et de Kopsch, ne sont, en réalité, qu'une seule structure. Ce réseau est indépendant du chondriome et du vacuome.

CYTOCHEMICAL AND CYTOPHYSIOLOGICAL PECULIARITIES OF NERVE TISSUE BIOLOGICAL ORGANISATION

A. L. SCHABADASCH

There is no doubt about nerve cell functional asymmetry, although its morphological substrate has little been found out. In a number of histochemical indicators we have managed to clear up important physico -chemical peculiarities of proteins and nucleoproteins in different parts of a neuron and its organoids. This brings us nearer to the study of the biological basis of a nerve cell spacial polarisation. We have observed clear cut differences in isoelectrical points (i.e.p.), typical for definite structures: mitochondria, tigroid clumps, cytoplasm, axoplasm and synaptic terminals in the nervous system at relative rest – in particular. At excitation, narcosis or inhibition processes, the i.e.p. displacements are observed, alterating normal rations (depending on the functional state) both to the side of deepening differences and to the side of their levelling.

In the main, physiologically moderate function is histochemically reflected only through the changes of physico-chemical characteristics and inter-relationships of the system components. I.e.p. gradient of a neuron structures is an important factor of morphogenesis and biological properties of the nerve tissue.

COMPARATIVE HISTOCHEMISTRY OF NEURONS DIFFERING IN THEIR FUNCTION

G. ROSKIN

1. Each type of neurons differs according to its physiological characteristic not only in structure, but in chemical composition as well. Thus, as it is impossible to give full characteristics of neuron types by means of a fully structural description, they should be supplemented with cytochemical data.

2. In a number of neurons cytochemical divergences are so great that they can be revealed with sufficient certitude by modern histochemical methods.

This fact was proved by a comparison of cytochemical reactions in sensory neurons of spinal ganglia with those in motor neurons of spinal cord, the following components of the cyto- and karyoplasm of the above cells having been investigated.

1. Amino acids (arginine, histidine, triptophane).
2. Basic and acid proteins; histones.
3. Nucleic acids (DNA and RNA) and nucleotides.
4. Glycogen and glycoproteids.
5. Lipids.
6. Plasmal.
7. Glutathione and SH-groupes.
8. Alkaline and acid phosphotases.
9. Dehydrase and succinodehydrase.

3. Each type of neurons cannot be characterised by any single component of protoplasm enumerated above, but by a regular complex of chemical and biochemical properties.

4. Differences between various types of neurons are limited not only by those of chemical and biochemical nature. Together with qualitative and quantitative distinctions a topographic distribution of protoplasmic components is of great importance. Thus, the types of neurons differ from each other not only cytochemically, but also in their cytotopochemical characters.

5. In diverse types of neurons ribonucleic acid may be in a variously strong bond with the proteins of protoplasm and nucleolei.

ZUR HISTOCHEMISCHEN CHARAKTERISTIK EINER DIPHTHERISCHEN POLYNEURITIS

G. D. KNJASEWA

Lehrstuhl für pathologische Anatomie
I. Moskauer Sechenov Medizinische Institut, S.S.S.R.

Die Zugabe einer subletalen Dose von Diphtherietoxin löst bei den Meerschweinchen die Entwicklung von Polyneuritis aus, die nach Morphologie, Entstehungsfristen und Klinik einer diphtherischen Polyneuritis des Menschen änlich ist. Die elektrophysiologischen, histochemischen und morphologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass anfangs (an den 3. – 4. Tagen) die funktionellen Verletzungen des neuro-musculären Apparates erscheinen, die sich in der Herabsetzung der elektrischen Erregbarkeit und Labilitäte äussern und denen sich Paresen erst am 21. Tage anschliessen. Innerhalb dieser Fristen (von den 3. – 4. bis zu den 10. – 15. Tagen) wurden histochemisch die Stoffwechselverletzungen der Schwannschen Elemente des Nervs und der Sohole der motorischen Endplatten die Aktivitätsherabzetzung der unspezifischen Cholinasterase und Aktivitätserhöhung der spezifischen Cholinesterase festgestellt; in der perinucleären Zone des Zytoplasmas und in den Kernchender Schwannscher Zellen vermehrt sich der Ribonucleirsäuregehalt, im Kern aber erhöht sich der Desoxyribonucleinsäuregehalt. Bis zum 21. Tage wird die Aktivität der spezifischen Cholinesterrase, Intensität den Reaktion auf Protein auf und SH-Gruppen der Proteinherkunft im Achsenzylinder und in den Spongiosastrukturen des Zytoplasmas der Schwannschen Zellen herabgesetzt. Der entstehende und fortschreitende Markzerfall führt zum Erscheinen der Phosphatidenzerfallsherde mit negativen Feyrter-Reaktion, in denen nach der Bearbeitung durch Oxydationsmittel die Osiumherstellung vor sich geht. Die Untersuchungen haben eine wichtige Rolle der Stoffwechsel – verletzungen in den Schwannschen Elementen bei der Entstehung der funktionellen Verletzungen und bei Markzerfall gezeigt.

FUNCTIONAL CYTO- AND HISTOCHEMISTRY OF CORTI'S ORGAN

J. A. VINNIKOV

Laboratory of evolutionary Morphology, I. M. Setchenov Institute of Evolutionary Physiology, Ac. of Sci., USSR

Localization of a number of chemically active substances in receptor hair cells, both resting and under conditions of auditory influence (the application of the sound of definite frequency and intensity 200–2000 cycles per second, 95 decibels) was studied with the help of vital isolation of cochlea and Corti's organ.

The hair cells contain granular glicogen (which under the action of sound becomes diffusive) and phosphorylase, which changes its activity.

The ferments of oxydative cycle–succindehydrase and cytochromoxidase are localized in mitochondria of hair cells.

The ferment activity increases under the auditory influence, while mitochondria redistribute and swell.

The distribution of nucleic acids, summarized protein, SH and COOH groups is regularly changed under the action of the sound.

The presence of acetylcholinesterase as well as the nature of its distribution in receptor hair cells and in the region of spiral ganglion nerve terminations were established. The ferment activiti is changed under the auditory influence.

Thus, both aerobe and anaerobe metabolism, complex protein processes and acetylcholine break during impulse transmission underlie the stimulation of Corti's organ.

The specificity of excitation is evidently determined by peculiarities of molecular organization of Corti's organ hair cells.

CONTRIBUTION HISTO-CHIMIQUE À L'ÉTUDE DE LA NEUROSÉCRÉTION ENCÉPHALO-HYPOPHYSAIRE

A. L. POLÉNOV

Institut de médecine Pavlov, Léningrad, URSS

Bien que nous disposions d'un nombre considérable de recherches dans le domaine de la neurosécrétion hypothalamique, nous avons jusqu'à ce dernier temps une idée assez vague sur le rôle biologique et sur la nature chimique de la neurosécrétion chez les vertébrés.

En même temps que les recherches sur la morphologie comparée et les recherches sur l'histo-physiologie écologique du système diencéphalo-hypophysaire sécréteur, nous avons aussi effectué quelques observations histo-chimiques. On a obtenu des réactions chimiques des acides nucléiques, des polysaccharides, des graisses, des lipoïdes et d'autres combinaisons; notamment, pour mettre en évidence les nucléoprotéides, on se servait du microscope ultra-violet.

D'après nos propres recherches effectuées sur différentes classes de vertébrés, nous distinguons deux variétés principales de neurosécrétions hypothalamiques: l'une gomoripositive qui d'après sa nature chimique, n'est qu'une lipoprotéide et une glycolipoprotéide et une autre variété — gomorinégative ou oxyphile — qui est une protéine.

Au cours de la formation de ces deux variétés de neurosécrétion, on peut observer des modifications dans la quantité de RNA du cytoplasme de la nucléole et aussi dans la quantité de DNA nucléaire ce qui serait en raison de la participation de ces acides à la synthèse de la neurosécrétion. Ces données sur les modifications au cours de processus vitaux dans les neurones sécréteurs confirment celles de nombre d'auteurs qui les ont attribué, à l'inconstance de la quantité de cet important composant de la substance nucléaire. Nos observations demontrent que dans la neurosécrétion seraient renfermées des substances biologiques actives du type de neurohormones.

GLYCOGEN IN THE RETINA

T. KUWABARA, and D. G. COGAN

Our finding that glycolytic dehydrogenases were concentrated in Müller's fibers has prompted a study of glycogen distribution in the retina. This has been the subject of controversy in the past literature.

By controlled fixation procedures and periodic acid Schiff reactions we found the highest concentration of glycogen in Müller's fibers. The amount varied with different species but approximately paralleled the activity of the glycolytic oxidative enzymes. In retinas damaged by IAA or disease the glycogen and the glycolytic enzymes were found to be proportionately increased.

Incubation of retinas in appropriate media resulted in distinct synthesis of glycogen in vitro by Müller's fibers and probably by other retinal cells. This again was greater in retinas with pathologic gliosis.

CONDITIONS DE FIXATION ET CYTOCHIMIE COMPARÉE DES ÉLABORATIONS FIGURÉES DANS LES CELLULES NERVEUSES DES GANGLIONS VÉGÉTATIFS ET RACHIDIENS

R. SEITE

Faculté de Médecine, Boulevard d'Alés, Marseille

Des recherches antérieures ont démontré l'existence de phénomènes d'élaborations nucléaires, distincts de la neurosécrétion hypothalamique, dans de nombreuses catégories de cellules nerveuses; c'est ainsi que des granulations, des gouttelettes sont visibles dans le nucléoplasme, le cytoplasme et enfin dans les prolongements de divers neurones (ce dernier phénomène étant particulièrement net dans les prolongements des cellules de Purkinje du cervelet, dans les axones des cellules ganglionnaires rachidiennes par exemple). Le présent travail est limité à l'étude de la cytochimie des produits d'élaborations des neurones ganglionnaires végétatifs et rachidiens.

Le premier point important est l'influence du prétraitement (fixation) sur ces produits.

Des essais effectués avec 40 formules (classiques ou originales) de fixateurs montrent que les conditions de fixation sont très précises:

– la présence de mercure dans le mélange fixateur est une condition nécessaire pour leur mise en évidence (alor que d'autres métaux tels que le cadmium, le calcium, le magnésium, le zinc sont inéfficaces);

– le mercure doit être associé au formol (alors qu'utilisés séparément ils sont également inefficaces);

– le bichromate de potassium (présent dans une formule comme le Zenkerformol par exemple) n'est pas indispensable et modifie seulement les affinités tinctoriales ou certaines réactions histochimiques du matériel élaboré.

Les réactions histochimiques proprement dites mettent en évidence des analogies fondamentales entre les produits élaborés par les neurones ganglionnaires végétatifs et rachidiens.

Dans les deux cas, il s'agit avant tout de complexes lipo-protéiques à protéines soufrées. La présence constante de soufre (sous la forme de groupes sulfhydriles ou de ponts disulfures) nous paraît hautement significative et pourrait, en tous cas, être à l'origine des conditions si particulières de fixation.

Les différences quantitatives et peut-être qualitatives portent essentiellement sur les fractions polysaccharidiques.

Les conditions de fixation, l'aspect morphologique du matériel élaboré conduisent à penser que celui-ci ne correspond pas à une structure de la cellule vivante.

Les images observées constituent vraisemblablement des semi--artefacts produits par la formation d'un complexe entre le métal du fixateur et les substances constitutives.

Tous ces caractères paraissent conférer à ces produits d'élaboration une individualité remarquable pouvant être d'une haute signification fonctionnelle.

HISTOCHIMIE DES CELLULES GANGLIONNAIRES DE LA MOELLE

H. B. TEWARI et G. H. BOURNE

Département d'anatomie, Université d'Emory, Atlanta, Georgie, É-U.

Les neurones des ganglions de la moelle ne donnent aucune réaction avec les techniques standard pour les phospholipides. Les préparations de mitochondries révèlent la présence de granulations positives dans le cytoplasme. Dans certaines cellules on trouve que ces granulations sont périnucléaires alors que dans d'autres elles sont localisées dans la périphérie ou occupent une position intermédiaire. Dans un certain nombre de cellules on constate une distribution uniforme dans le cytoplasme, mais dans ce cas les granulations sont associées avec les vacuoles.

Les préparations colorées par le noir soudan, le soudan IV et le sulfate de bleu de Nil indiquent une réaction positive pour les granulations ou les corps filamenteux, avec une distribution similaire à celle des mitochondries. Dans les cellules où existe une condensation perinucléaire des mitochondries et des autres granulations, le nucléole est toujours en contact avec les membranes nucléaires et on peut voir dans certaines préparations l'indication d'une extrusion de particules de nucléoles dans le cytoplasme. La distribution de l'ATPase, de la cytochrome-oxydase, de la succino-déhydrogénase et de la forme non-spécifique de l'estérase, révèle une association avec des particules ayant la même taille que les mitochondries et paraissant suivre le même cycle de distribution. Nos resultats suggèrent que les neurones passent par un cycle sécrétoire.

Dans les amphicytes les préparations de mitochondries révèlent la présence de granulations qui sont réparties également dans le cytoplasme mais aucune granulation n'apparaît avec les techniques au noir soudan, au soudan IV ou au bleu de Nil. D'autre part les techniques faisant appel au rouge congo de Sloper, et à l'acide phosphotungstique, utilisées pour mettre en évidence les neurosécrétions, donnent de très fortes réactions dans les amphicytes mais sont sans effet sur les cellules ganglionnaires de la moelle.

HISTOCHEMICAL CHANGES IN DIFFERENT ELEMENTS OF TISSUE UNDER THE PARTIAL REMOVAL AND CHRONIC IRRITATION IN THE CORTEX OF THE LARGE CEREBRAL HEMISPHERES

P. ELISEEV

Moscow, U.S.S.R.

Under the partial removal and chronic irritation of the cortex of cerebral hemispheres the following changes can be observed in histochemistry of the nervous cells in the cortex of the large cerebral hemispheres.

During ten days after the removal and irritation of the cortex glycogen can be found, while under the normal condition there is no glycogen at all. The maximal accumulation of glycogen can be observed in three or five day after the operation, on the first day it can be found around the vessels and in the interstitial substance, but in three or five days it can be found as irregular granules in the nervous and glia-cells. When irritating the cortex glycogen appears in larger doses than under decortication. The quantity of amino acids such as: tryptophan, terosin and histidin is increasing under the partial decortication and irritation especially on the fifth day after the operation.

In case of removal and irritation of the cortex the division of nervous cells by mitoses can be observed.

The amout of citochromoxydase in blood and bone marrow diminishes and the quantity of hemoglobin in erythrocytes diminishes as well.

Under decortication there is a diminution in the quantity of PHK (RNK) in the centre of aseptic inflammation in the cells of connective tissue and under irritation of the cortex in the large cerebral hemispheres the quantity of PHK (RNK) increases. In citoplasm of the neutrophile leucocytes which are being removed into the centre of inflammation PAS positive granules of different size can be found.

These granules represent glycogen which is being freed in connection with special graininess and is being detached in the water of granules.

Approaching a heterogeneous body the quantity of leucocytes containing glycogen as well as the quantity of glycogen in citoplasm in increasing.

When the leucocytes are destroyed glicogen is found in the interstitial substance.

ACQUISITIONS RÉCENTES EN HISTOCHIMIE DENTAIRE

R. WEILL

Institut D'Histochimie Médicale, Faculté de Médecine
et École Dentaire, Paris

Bien que des tissus différents concourent à l'élaboration de la dent, leurs développements sont liés fonctionnellement. Il est donc intéressant de rechercher leurs rôles respectifs, que les techniques histochimiques permettent de saisir avant l'achèvement de la différenciation morphologique.

Nous pouvons suivre les transformations cellulaires et tissulaires au cours de l'histogenèse. Les méthodes de coloration des polysaccharides et l'histoautoradiographie avec le 35 S sulfate conduisent à des observations convergentes.

Au cours de l'évolution du germe, les colorations au bleu de toluidine métachromatique et au bleu alcian correspondent aux localisations de 35 S sulfate. Il est vraisemblable que l'on puisse accorder à l'enrichissement du mésenchyme embryonnaire en polysaccharides un rôle important du point de vue de la morphogenèse. La rigidité accrue de la papille en fait un moule interne sur lequel vient prendre forme l'organe de l'émail.

Lors de l'élaboration des tissus, ces caractéristiques s'accentuent. On observe une sécrétion de mucopolysaccharides acides au niveau du pôle dentinaire des odontoblastes et une zone juxtacytoplasmique chargée de polysaccharides acides qui subsiste tout au long des canalicules de Tomes, alors que la matrice dentinaire minéralisable prend l'A.P.S.

Du côté adamantin, la matrice est métachromatique, alors que l'on peut observer dans le stratum intermedium l'existence de granulations métachromatiques ou A.P.S. positives.

Les recherches faites à l'aide du 35 S sulfate et du 14 C bicarbonate permettent de révéler la cinétique de cette élaboration, alors que l'utilisation du 32 P et 45 Ca rend compte des mécanismes de minéralisation.

Les colorations des protides sulfhydrilés et disulfures et l'utilisation de la 35 S méthionine mettent en évidence l'existence de ces matériaux dans les cellules pulpaires et adamantines. Alors que les groupements SH et SS, ainsi que la méthionine marquée se manifestent discrètement dans la dentine et les fibres de Tomes, l'émail est fortement chargé et l'incor-

poration de 35 S méthionine à la matrice adamantine peut servir de test de l'activité adamantogène.

Les recherches enzymologiques ont porté tout particulièrement sur les phosphatases. La phosphatase alcaline apparait précocement et se localise dans les zones odontogènes avant même l'élaboration des tissus minéralisables, et subsiste dans l'organe jeune.

En conclusion, l'histochimie dentaire permet d'apporter de précieuses connaissances sur certains mécanismes de l'élaboration tissulaire, et de concevoir sous un aspect fonctionnel et dynamique les problèmes de la genèse et de la trophicité de la dent.

ELABORATION OF DENTINAL COLLAGEN IN ODONTOBLASTS AS SHOWN BY RADIOAUTOGRAPHY AFTER INJECTION OF LABELLED GLYCINE AND PROLINE

C. P. LEBLOND

Department of Anatomy, McGill University, Montreal, Canada

En vue d'étudier la formation des protéines de la matrice de l'os et de la dent, nous avons pris comme sujets d'étude chez le rat et la souris une série d'acides aminés marqués (glycine-H^3 ou -C^{14}, proline-C^{14}, leucine-H^3, methionine-S^{35}, -C^{14} ou -H^3). Les animaux furent sacrifiés à plusieurs intervalles de temps après une seule injection de la substance à étudier. Après décalcification des tissus durs, les coupes furent radio-autographiées par la technique dite "coating".

La quantité de chaque acide amine retrouvé dans la matrice néoformée était considérable dans le cas de la glycine et de la proline, mais faible dans les autres cas. Cependant, le déroulement des phénomènes était essentiellement le même pour l'os et la dentine, quel que soit l'acide amine utilisé (mais les différences étaient profondes en ce qui concerne l'émail). Décrivons en détail ce qui se passe au niveau des zones de croissance de la dentine et de l'os en utilisant la glycine-H^3.

Dans la dentine, une demi-heure après l'injection, l'élément marqué se retrouve dans le cytoplasme des odontoblastes. Dès la 4ème heure, l'élément a quitté les cellules et s'observe dans la prédentine. Plus tard, il se voit sous forme d'une bande de réaction dans la dentine.

De même dans les zones de croissance osseuse, l'élément marqué apparaît dans le cytoplasme des ostéoblastes et passe rapidement dans le liseré préosseux qui devient plus tard la matrice calcifiée tout en retenant sa radioactivité.

Comme des images identiques s'observent avec la glycine marquée au C^{14}, on en conclut qu'il s'agit bien de la prise de glycine elle-même et non d'un de ses métabolites. Or, la glycine est un précurseur du collagène. Les images montraient-elles la synthèse du collagène? C'est alors que, pour s'assurer qu'il s'agissait bien de cette protéine, nous

avons injecté le précurseur le plus spécifique du collagène, la proline. Le résultat fut en tous points semblable au précédent.

On en conclut qu'odontoblastes et ostéoblastes élaborent un collagène ou un précurseur du collagène, qui est ensuite secrété en dehors de la cellule pour devenir le collagène de la dentine et de l'os.

STAINING OF NERVES IN TRANSPLANTED TEETH

H. S. FLEMING

Howard University College of Dentistry Washington, D.C.

Tooth germs of guinea-pigs and rabbits at different stages of development were transplanted to the brains of guinea-pigs according to the method of Fleming. These were allowed to remain at this transplantation site for varying periods from 20 days upwards. Upon sacrifice of the hosts, the transplants were recovered and fixed at once in formalin or by the Zenker's – 80 per cent alcohol method. They were then decalcified, blocked and cut at 7 microns. Staining was by several different special stains to emphasize the nerves in these recovered transplants.

The results indicate that the nerve elements of these transplanted teeth will survive transplantation. In addition, medullated or myelinated nerve fibres of the teeth survive transplantation as well as other types and these surviving nerves in the transplants compare very favorably with those nerves of teeth in situ. It is likewise important to note that nerve elements of the teeth as well as other component parts survive better when transplanted at earlier rather than late stages of development. These experiments, therefore, support a hypothesis that transplants of the teeth can adjust much better to new environments while in their early stages of development. This may be due to a greater power of autonomy, during initial growth and development.

A POSSIBLE MECHANISM OF PAIN CONDUCTION IN TEETH

J. K. AVERY

The University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

HISTOCHEMISTRY OF MUCOUS MEMBRANES

G. QUINTARELLI

Department of Oral Pathology — University of Alabama Medical Center
Birmingham, Alabama

ÉTUDE COMPARÉE DE LA DENT EN ÉVOLUTION CHEZ LE HAMSTER, EXÉCUTÉE AU MOYEN D'UN PROCÉDÉ ULTRAMICROCHIMIQUE QUANTITATIF ET D'UNE MÉTHODE HISTOCHIMIQUE DE COLORATION

S. L. BONTING

National Institutes of Health, Bethesda, Md.

KLAUS NUKI

Univ. of Illinois College of Dentistry, Chicago, Ill., USA

La méthode quantitative histochimique de Lowry a été appliquée pour étudier le développement de la dent chez le hamster et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par les méthodes de coloration histochimique classiques. Les germes dentaires des premières dents molaires fûrent prélevés zéro, 1, 2, 3 et 4 jours après la naissance. Après avoir été gelés à l'azote liquide ils fûrent coupés en tranches de 16μ d'épaisseur avec un microtome cryostatique à une température de -20℃, puis lyophilisés. Des fragments représentants 10 zones histologiquement différentes furent obtenus par microdissection et pesés dans une ultramicro-balance à fil de quartz (sensibilité 3×10^{-10}g), puis analysés pour déterminer leur phosphatase alcaline (l'APP). L'activité de l'APP variait entre 0,44 moles de substrate scindé par kilogramme de poid sec par heure d'incubation à 37℃ (unités MKH) dans l'épithélium gingival au jour zéro, et 398 MKH dans le stratum intermedium au 4-e jour. Dans la plupart des zones l'activité de l'APP augmentait avec l'âge, sauf dans les adamantoblastes et dans la couche d'émail-dentine, oû elle décroissait. Une activité de l'APP maximale fût déterminée non pas dans les cellules les plus intimement associées avec la calcification (les adamandoblastes et les odontoblastes), mais dans les cellules qui les avoisinent directement (le stratum intermedium et la couche de pulpe dentaire subodontoblastique). Ce fait doit être considéré comme preuve pour la validité de la théorie de calcification proposée par Neuman et Neuman.

Les resultats obtenus par les procédés de coloration s'accordaient qualitativement avec les données quantitatives concernant l'APP, mais une réaction négative fût trouvée pour les valeurs jusqu'à 21 MKH, même quand les périodes d'incubation étaient décuplées.

ANTIPHLOGISTICA- UND ANTIRHEUMATICAPRÜFUNGEN MIT HISTOLOGISCH-HISTOCHEMISCHEN METHODEN

LINDNER

Hamburg

Im Rahmen unserer Grundlagenforschungen am Bindegewebe mit modernen morphologischen Verfahren ist es auch notwendig, die Wirkung bindegewebsaktiver Substanzen zu prüfen. Dazu gehören neben Hormone und Vitaminen die sog. Antiphlogistica und Antirheumatica.

Bei tierexperimentellen Untersuchungen dieser Stoffe werde in der Regel 4 Fragen geprüft:

1. Welche Wirkung hat die betreffende Substanz an der Stelle ihrer stärksten Konzentration, nämlich im Injektionsbereich, auf das lokale Bindegewebe?
2. Welche allgemeinen stoffabhängigen Veränderungen treten an den verschiedenen Bindegeweben des gesamten Tierkörpers auf?
3. In welcher Weise werden Einzelteile oder das Ganze eines zur Prüfung des betreffenden Stoffes besonders geeigneten speziellen Untersuchungsfeldes durch die jeweilige Substanz (z.B.ein Antiphlogisticum oder Antirheumaticum) gegenüber Vergleichspräparaten verändert?
4. Welche Veränderungen treten in den übrigen Organen auf a) als Folge der stoffabhängigen Bindegewebsprozesse (z.B.Nachweis von Abbauprodukten, speziell im RES, Blut und Niere) oder b) als direkte Stoffeinwirkung (i.S.toxischer Parenchymschädigungen, Nebenwirkungen usw.).

ad 1: Zur Prüfung der lokalen Veränderungen wurden histologisch-histochemische und histoenzymatische Vergleichsuntersuchungen der Injektionsstellen verschiedener Antiphlogistica und Antirheumatica (wie auch anderer Kontrollsubstanzen und bindegewebsaktiver Stoffe) durchgeführt, für Butazolidin auch parallel dazu systematische elektrometrische und kolorimetrische Untersuchungen.

ad 2: Allgemeine Veränderungen des Bindegewebes können an den 3 Bestandteilen desselben: an Zellen, Fasern und Grundsubstanzen gefunden werden, mit histochemischen Methoden z.B. sog. Grundsubstanzentmischungen (deren Lokalisation stoffabhängig ist) usw. Quantitative Aussa-

gen über stoffabhängige Verönderungen der Fermentaktivität von Bindegewebszellen sind mit histochemischen Methoden schwierig.

ad 3: Zur Prüfung an speziellen Untersuchungsgebieten sind für die Antiphlogistica verschiedene Entzündungsmodelle gebräuchlich: a) Das Setzen von Granulomen mit zahlreichen Phlogistica – wir benutzten chemisch wohl definierte, in ihrer Wirkung auf das Bindegewebe von uns genau untersuchte Phlogistica; b) die sog. Selye'schen Granulomsäcke (Einführung einer Luftblase unter die Rückenhaut mit Injektion des betreffenden Phlogisticum, folgende Bildung eines Granulationsgewebssackes (mit Flüssigkeitsinhalt fur biochemische Untersuchungen); c) der sog. cottonpellet-Test (subcutane Implantation von Wattekugeln mit folgender Ausbildung eines umgebenden und einwachsenden Granulationsgewebes). Bei allen Modellen werden also die Entzündung als Ganzes und nicht Symptome derselben (wie bei vielen pharmakologischen Prüfungen) untersucht. Zur Testung von Antirheumatica mit morphologischen Methoden ist nach unseren Erfahrungen die tierexperimentelle hyperergische Arthritis als bestes Modell zu bezeichnen (kurze Angaben über Sinn, Methodik und Ergebnisse dieser Untersuchungen mit mehreren Antiphlogistica).

ad 4: a) Dazu gehören neben histôlogisch-histochemischen Untersuchungen der abhängigen Gewebe und Organe einschliesslich der Blutzellen elektrophoretische und chromatographische Serum- und Urin-Prüfungen zur Frage einer Erhöhung der Glyko- und Mukoprotein- bzw. Mukopolysaccharidwerte sowie eines Anstieges von Abbauprodukten dieser aus der Bindegewebsgrundsubstanz stammenden Stoffgemische. Die in Kürze berichteten Befunde lassen weitere- Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der Pharmaka zu.

Der vorliegende Übersichtsbericht ist mit konkreten Ergebnissen der einzelnen Untersuchungsgänge anhand von tabellarischen Zusammenfassungen, Diagrammen und Farbdias belegt. Die Ergebnisse sind ein spezielles Beispiel dafür, welche Bedeutung heute die modernen morphologischen Untersuchungsverfahren für die Prüfung von Pharmaka gewonnen haben.

CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF NEUROTROPIC DRUGS

J. H. QUASTEL

McGill-Montreal General Hospital Research Institute,
3619 University Street, Montreal, Canada

It is possible to obtain some information on the cytochemical localization of neurotropic drugs by studies of the effects of such substances on the metabolism of whole cells, as represented by surviving tissue slices, or of cellular preparations such as mitochondria.

Changes of the K^+/Ca^{++} ratio in the medium bathing brain cortex slices bring about large changes in the respiration of the brain and of the rates of conversion of radioactive glucose into radioactive amino acids. Such changes do not affect metabolism of brain homogenates or preparations in which the cell membranes have been disorganized. Thus the cationic stimulation of brain cortex metabolism *in vitro* is a phenomenon associated with events at the cell membrane.

The presence of ethanol, higher aliphatic alcohols and tribromethanol at low concentrations suppresses the cationic stimulation of brain cortex slices, but these alcohols at the same concentrations have no effect on brain mitochondrial respiration or on the mitochondrial P/O ratio. These results point to the association of the alcohols with components in the brain cell membrane which exert rate limiting effects on cell metabolism.

Acetylcholine, which affects P^{32} turnover in the phospholipids of brain, also plays a role at the cell membrane, probably by affecting membrane transport of sodium and potassium ions. Potassium ions act in a manner similar to acetylcholine in stimulating P^{32} turnover in the phospholipids of the brain cell.

Protoveratrine, well known for its excitation of neuromuscular and nervous systems, has effects on the metabolism of the brain cell, resembling that due to increase of the K^+/Ca^{++} ratio in the medium bathing the cell. Its action may be satisfactorily interpreted as due to an immobilization of, or competition with, calcium ions at the membrane. Cocaine antagonizes the action of protoveratrine *in vitro* and apparently acts by diminution of the K^+/Ca^{++} by a change of membrane transport, or by replacing the calcium ion at a membrane receptor.

The presence of lecithinase in the medium bathing brain tissue brings about a large change in the P/O ratio of brain cortex slices indicating the existence of phospholipids in the cell membrane that control cell respiration and where certain classes of narcotics are presumably combined.

DÉTECTION HISTOCHIMIQUE DE QUELQUES ÉLÉMENTS MINÉRAUX UTILISÉS EN THÉRAPEUTIQUE

J. TURCHINI et P. CASTEL

Montpellier

Après avoir envisagé différentes techniques classiques de détection histochimique d'éléments minéraux, les auteurs rapportent un certain nombre de techniques nouvelles qu'eux ou leurs élèves ont mis au point.

Ils envisagent successivement la détection de l'arsenic, du bismuth, de l'antimoine, de l'étain et enfin du cadmium, cette dernière détection utilisant soit l'hydrogène sulfure, soit divers alcaloides.

DIE PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSBARKEIT DER STROMAREAKTION BEI EXPERIMENTALTUMOREN

H. SCHMIDT-MATTHIESEN

Universitats-Frauenklinik Göttingen, Allemagne

Um für die medikamentöse Zusatztherapie des Krebses eine theoretische Grundlage zu finden, wurden zahlreiche häufig benutzte Mesenchymwirkstoffe histochemisch auf ihre Effekte am Tumorbindegewebe geprüft (Ehrlich -Ca; Yoshida-Sarcom).

Ein Teil der Wirkstoffe ist bei entsprechender Dosis primär gewebstoxisch und nekrotisierend. Die Proliferation der Mesenchymzellen, MPS-Produktion und Fibrose sind als selbständige, reparative Vorgänge anzusehen, die lediglich noch durch das toxische Agens oder dessen Begleitstoffe modifiziert werden.

Andere Pharmaka hingegen wirken unmittelbar hemmend bzw.stimulierend auf die am Tumorbindegewebe ablaufenden Reaktionen ein. Histochemisch lässt sich zeigen, dass die verschiedenen Mittel einen unterschiedlichen Angriffspunkt innerhalb der mesenchymalen Reaktionskette besitzen: Entweder wird eine unspezifische Zellproliferation ausgelöst (Polyvinylpyrrolidon, Eiweiss, AF 2, Adenosinderivate), die Phosphataseaktivität der Fibroblasten stimuliert (Echinacea purpurea), die MPS-Bildung intensiviert (Echinacea purpurea, DOCA) oder die Fibrillogenese gesteigert (DOCA, Adenosinderivate). Bei der phasenbegrenzten Wirkung dieser Mittel ist es erforderlich, dass das Bindegewebe bereits von anderer Seite her aktiviert worden ist. Ein solcher Anreiz geht z.B.von zerfallenden Anteilen der Tumoren aus. Demgegenüber entfalten vitale Tumoranteile keine proliferativen oder fibroplastischen Reize (zumindest kommt es beim Tiertumor nicht zur Manifestierung derselben). Die Wirkung der geprüften Pharmaka ist also an bestimmte gewebliche Voraussetzungen gebunden.

Die pharmakologisch oder -toxisch erreichbaren Effekte am Tumorbindegewebe lassen sich histochemisch vollig mit jenen am normalen Bindegewebe vergleichen, sie werden von den benachbarten Tumorzellen nicht verhindert. Andererseits sind sie aber nur kurzfristig beständing sie unterliegen schnell der Zerstörung durch die Tumorzellen.

INTRACELLULAR ACCUMULATION AND CRYSTALLISATION OF THE ANTITUBERCULOSIS RIMINO-COMPOUND, B.663

M. L. CONALTY and R. D. JACKSON

Laboratories, Medical Research Council of Ireland,
Trinity College, Dublin, Ireland

The high antituberculosis activity of Rimino-compounds of the phenazine series has been demonstrated in these laboratories and confirmed in others. It has proved possible to demonstrate this activity even when treatment has been completed one to four weeks before infection with tubercle bacilli. It has been found that on administration of these compounds high concentrations of the drugs are built up and are retained in the tissues.

The communication will deal specifically with one of these compounds, B.663 (2-p-chloroanilino-5-p-chlorophenyl-3:5-dihydro-3-isopropyliminophenazine). High tissue concentrations are due to the accumulation of drug within macrophages, and continued treatment can result in intracellular crystallisation. The sequence of events leading to this unique phenomenon and the possible mechanisms involved, will be discussed. The effect of these intracellular accumulations on cell activity, including phagocytosis, will be described, together with details of their influence on the histological pattern within various tissues.

HISTOCHEMISTRY IN EXPERIMENTAL CANCER CHEMOTHERAPY

M. A. PRESNOV

Institute of Experimental and Clinical Oncology,
Academy of Medical Sciences, U.S.S.R., Moscow

1. The results of histochemical investigation of the action of some antitumour drugs on transplanted rat and mouse tumours will be reported.

2. The changes of the tumour cells and connective tissue stroma found by means of more than 10 various histochemical methods will be demonstrated.

3. The application of the histochemical methods, e.g. demonstration of nucleic acids, neutral fat, glykogene, metachromasia, some enzymes (phosphatase, esterase, oxydative enzymes etc.) showed their great value for experimental studies in the new branch of oncology-cancer chemotherapy.

CHANGES IN NUMBER AND ANHYDROUS MASS OF ANTERIOR PITUITARY CELLS OF RATS AFTER ADMINISTRATION OF PROPYLTHIOURACIL

R. C. BAHN, G. T. ROSS, R. W. SCHMIT and R. C. McELMURY

Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester, Minnesota

LES MODIFICATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE TISSULAIRE DES LAPINS INTOXIQUÉS PAR L'ACIDE SILICIQUE

M. GÜNDISCH, T. FESZT, I. SZABÒ et Z. DÉZSI

Chaire d'Histologie d' Institut de Médecine
et Pharmacie de Tîrgu-Mures, Roumanie

Après un traitement intraveineux avec SiO_2 des lapins, l'activité histochimique de la phosphatase alcaline, augmente dans les parois interalvéolaires pulmonaires, dans les espaces portes et régions périphériques des lobules hépatiques et même dans les corpuscules de Malpighi de la rate. Dans le foie, l'enzyme se révèle aussi en dehors des cellules.

Ces modifications s'expliquent comme des processus de dégénération cellulaire et de proliferation du tissu conjonctif à la suite d'intoxication chronique par le silicium.

L'activité phosphatasique acide a diminué elle même dans le cytoplasme des cellules hépatiques, ainsi que dans la rate, exprimant une atteinte de l'appareil enzymatique fonctionnel de la cellule.

HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PROTEIN-BOUND SULFHYDRYL GROUPS IN PLANT TISSUES

L. W. ROBERTS

Department of Botany, University of Idaho, Moscow, Idaho

COLORATION ARGENTIQUE D'UN COMPOSANT NUCLÉOLAIRE. ORIGINE ET COMPORTEMENT PENDANT LA MITOSE

N. K. DAS et MAX ALFERT

Départ. de zoologie, Université de Californie, Berkeley, Californie

À l'aide d'une nouvelle méthode d'imprégnation argentique on a étudié dans les cellules méristématiques des racines d'oignon le comportement cyclique d'un composé nucléolaire autre que L'ARN.

Ce composé semble être libéré dans le cytoplasme durant la prophase, est absent des chromosomes pendant la métaphase et l'anaphase et réapparaît autour des chromosomes au début de la télophase.

On démontrera que chaque chromosome tout entier contribue à la formation de ce composé.

THE LOCALIZATION OF NUCLEIC ACID SYNTHESIS IN ROOT MERISTEMS

F. A. L. CLOWES

Botany School, Oxford University, England

The classical methods of investigating apical meristems ignore rates of cell division and therefore lead to false conclusions about organization. The use of autoradiography in investigating the synthesis of DNA shows that there is a quiescent centre in root meristems where the cells do not divide at all or divide very rarely. This method depends upon the incorporation of precursors of DNA being equivalent to net synthesis and net synthesis indicating preparation for mitosis. These assumptions appear to be valid for meristems, though not necessarily so for other tissues, and the conclusions made from them can be confirmed by other methods. The degree of quiescence of the cells varies with the size of the apex, and is low in roots with single apical cells and in the early embryonic stages of larger roots. The cells of the quiescent centre may be induced to synthesise DNA and enter mitosis by suitable surgical or X-ray treatments. Quantitative results may be obtained about the ploidy of cells by measuring the rate of synthesis over short periods. The duration of the mitotic cycle may also be measured for all the parts of the meristem by counting the proportion of nuclei labelled after various exposures to the radioactive precursors of DNA.

HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE ENZYMES OF THE ROOT EPIDERMIS

CHARLOTTE J. AVERS

Dept. of Biology, Douglass College, Rutgers – The State University, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

Enzyme activities in *Phleum* have been correlated with development of hair and hairless cells of the tissue. The apical meristem initials were differentially active for succinic dehydrogenase and adenosine monophosphatase, but were equally active for other enzymes studied. Once the cells had left the meristem and entered the zone of elongation, both cell types showed no activity for these two enzymes, but were differentially active for acid phosphatase and cytochrome oxidase. Peroxidase activity differentiated these cells later as they prepared to mature morphologically. Only a few of the most apical cells showed glucose-6-phosphatase activity, and this enzyme did not appear to be active in mitotic or rapidly elongating cells of *Phleum*, whereas there was activity in other grasses studied. These enzyme activities apparently characterized the two kinds of epidermal cells at various stages of their development, and appeared long before morphological maturation and the end of elongation. The intracellular localizations were particulate or non-particulate in agreement with localizations obtained by other techniques. Enzyme localizations in meristem cells were also obtained for adenosine triphosphatase, dehydrogenases, and an esterase, in addition to those studied for their distribution in the several developmental zones of the root epidermis.

THE DISTRIBUTION AND LOCALIZATION OF NUCLEIC ACIDS IN ROOTS

W. A. JENSEN

Department of Botany, University of California, Berkeley 4, California

A SURVEY OF CURRENT APPROACHES TO QUANTITATIVE HISTOCHEMISTRY OF PLANT TISSUE

D. GLICK

Department of Physiological Chemistry, University of Minnesota,
Minneapolis, Minn

HISTOCHEMICAL STUDIES ON LIGNIN FORMATION

S. M. SIEGEL

Department of Sociology, University of Rochester, New York

HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PROTEIN-BOUND AMINO GROUPS

K. SURREY

Division of Biological and Medical Research,
Argonne National Laboratories, Lemont, Illinois

HISTOCHEMICAL STUDIES OF STEM MERISTEMS

R. M. TIEFEL

Department of Biology, Carthage College, Carthage, Illinois

A SURVEY OF THE SIGNIFICANCE OF ENZYME LOCALIZATION TO THE SOLUTION OF PROBLEMS IN PLANT PHYSIOLOGY

D. S. VAN FLEET

Department of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

ACQUISITIONS REGARDING ENZYMATIC HISTOCHEMISTRY IN PRENATAL DEVELOPMENT

F. ROSSI and E. REALE

Università di Genova, Istituto di Anatomia Umana Normale

Researches in enzymatic histochemistry during the prenatal development of man and other animals had, already in 1954, made it possible for Rossi, Pescetto and Reale to affirm that the activities of enzymes are to be introduced, on positive basis, among the factors presiding morphogenesis and histogenesis of the embryo and the foetus. These researchers, though not neglecting investigations other than on man, have related particularly their experiences in the human field. From 1954 to the present time, studies in activities in the embryo and in the foetus, also in the very earliest stages of its development, have multiplied both in the biochemical and in the histochemical field proving this to be an extremely fertile and most interesting ground and demonstrating that the collaboration of well known morphogenetic factors, as for istance the organizing centres, and of other not yet revealed relies on cellular processes which, more and more numerous, identify themselves with the group of chemical reactions catalyzed by enzymes.

Many other enzymes revealed by new techniques can be added today to those (non specific alkaline phosphathases, acid phosphathases, non specific esterases, succinicdehydrogenase) the intervention of which during development was illustrated by Rossi, Pescetto and Reale. Furthermore the improving of earlier techniques has led to a more exact qualification and localization of reactions.

These recent acquisitions, although not substantially modifying the conclusions reached in 1954 by Rossi, Pescetto and Reale, have introduced a quantity of new data both on man and on other animals, which data should be known and on which Rossi and Reale raport on the occasion of the First International Congress of Histochemistry.

ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES EN CULTURE DE TISSUS, PAR DES MÉTHODES AUTORADIOGRAPHIQUES ET BIOCHIMIQUES EMPLOYANT DES NUCLÉOSIDES PYRIMIDINIQUES MARQUÉS AU TRITIUM

L. E. FEINENDEGEN and V. P. BOND

Medical Research Center, Brookhaven National Laboratory,
Upton, L. I., N. Y.

L'intégration de cytidine marquée au tritium dans les acides nucléiques a été étudiée sur des cellules HeLa-S[3] en cultures de tissus. Des méthodes autoradiographiques et biochimiques ont été utilisées.

L'évolution chronologique du marquage de l'ARN observée par autoradiographies, et en particulier de la partie chromatinienne du noyau au cytoplasme et la démonstration de la conservation complète de la cytidine et de l'uridine de l'ARN macromoléculaire dans l'étude expérimentale du turnover, est en faveur de l'hypothèse du rôle de précurseur de l'ARN nucléaire vis-à-vis de l'ARN cytoplasmique.

L'entrée directe de la cytidine tritiée dans le métabolisme de l'ADN est totalement concurrencée par de l'uridine non-radioactive, partiellement par de la thymidine, pas du tout par de la desoxycytidine. Après une fixation initiale rapide de la cytidine marquée au tritium, une fixation continue des métabolites marqués a été observée même jusqu'à 48 h. après. Cette fixation tardive n'a plus été que partiellement concurrencée par la cytidine non-radioactive, à un degré moindre encore par l'uridine. Aucune différence n'a été observée entre l'action compétitive de la thymidine et de la désoxycytidine dans ce cas. L'analyse des temps de disponibilité après le marquage initial dans diverses conditions, a montré un temps de turnover constant pour le dernier précurseur. Ces résultats suggèrent l'existence d'un système fermé de précurseurs entre les nucléotides simples et l'ADN, qui ressemblerait à un compartiment intermédiaire avec un temps de turnover constant et dont la direction métabolique serait principalement vers l'ADN et, peut-être, l'ARN.

CYTOCHIMIE DU KINÉTOPLASTE DU TRYPANOSOMA CRUZI

YVONNE DELAUNEY et N. K. DAS

Université de Californie, Département de Zoologie, Berkeley

Des cultures en pleine division de *T. cruzi*, sur milieu agar-sang, ont été soumises à la thymidine-H3 (4 μc/cc) et à la cytidine-H3 (5 μc/cc). Des gouttes pendantes de cultures ont été exposées aux vapeurs d'acide osmique puis de formol neutre.

Les lames avec gouttes de cultures soumises à la thymidine-H3 ont été colorées au Feulgen avant d'être enveloppées de films autoradiographiques, tandis que dans le cas de la cytidine-H3, une coloration au bleu de toluidine a été faite après la pose des films sur les lames.

Nous pouvons confirmer les observations déjà faites à propos de la réaction Feulgen positive du Kinétoplaste, contenant de l'ADN.

D'autre part la coloration au Fast-green alcalin, permet de mettre en évidence la présence de protéines basiques (histones) dans les Kinétoplastes ainsi que dans les Noyaux. La substance du Kinétoplaste semble ainsi très proche de la chromatine dans ses caractéristiques cytochimiques essentielles.

Après de courtes expositions à la thymidine-H3 (jusqu'à environ 15 min.) soit les Kinétoplastes soit les Noyaux sont marqués dans la majorité des cellules et seules quelques cellules montrent des Kinétoplastes et des Noyaux tous deux marqués. Après de plus longues périodes d'incorporation, de 30 à 180 min., les Kinétoplastes et les Noyaux sont tous deux marqués dans la majorité des cellules. Ceci démontre que les temps de synthèse de l'ADN, peuvent jusqu'à un certain point se chevaucher mais ne sont pas exactement simultanés dans les deux structures. Les processus de la division ne coïncident pas, la division nucléaire précédant celle du Kinétoplaste. L'incorporation de la cytidine-H3 dans l'ARN se fait rapidement dans le noyau et est plus tard aussi visible dans le cytoplasme, ainsi que pour de rares cas dans le Kinétoplaste. On n'a pas pu encore déterminer si le marquage de l'ARN dans le Kinétoplaste est un effet spécifique ou un effet de superposition de l'activité cytoplasmique.

AUTORADIOGRAPHIC STUDIES OF H^3-THYMIDINE INCORPORATION IN NORMAL AND HYBRID FROG EMBRYOS

BETTY C. MOORE

Department of Zoology, Columbia University, New York

Incorporation of tritiated thymidine by the early embryos of diploid and androgenetic haploid *R. pipiens* and diploid and androgenetic haploid hybrids between *R. pipiens* ♀ × *R. sylvatica* ♂ has been studied. Two sorts of experiments were carried out. In one, H^3-thymidine was injected into an adult female *pipiens* and the radioactive eggs utilized. In the other, H^3-thymidine was injected directly into the eggs before first cleavage.

It has been demonstrated that there is an increased utilization of H^3-thymidine at the blastula stage as compared to early cleavage stages. It is concluded that cytoplasmic deoxyribopolynucleotides are used in chromosomal replication at early cleavage stages.

In *(pip) syl* embryos, utilization of *pipiens* cytoplasmic deoxyribopolynucleotides by *sylvatica* chromosomes in their replication could result in inexact copies of the genetic material, which would lead to abnormal development.

RNA AND DNA METABOLISM IN HUMAN TISSUE CULTURE CELLS STUDIED WITH TRITIATED CYTIDINE

L. FEINENDEGEN, V. P. BOND, W. W. SHREEVE
and R. B. PAINTER

Medical Research Center, Brockhaven National Laboratory,
Upton, L. I., New York

The autoradiographic technique combined with biochemical methods was employed to study aspects of RNA and DNA metabolism in human tissue culture cells, incubated with tritiated cytidine.

1. Tritiated cytidine was incorporated within minutes into all intact nuclei of HeLa S^3 cells and Osgood leukemic cells. The label subsequently increased over the nucleoli and over the cytoplasm.

2. This sequence of labeling was defined and quantitatively observed in turnover studies, in which the cultures were incubated with the labeled nucleoside for a short time only followed by growth in carrier cytidine supplemented medium. While nuclear label decreased, cytoplasmic label became visible and most nucleoli temporarily accumulated label with a maximum at 1 hour after cessation of incubation with tritiated cytidine.

Desoxycytidine as carrier in the new medium failed to prevent further uptake of tritiated cytidine, which was apparently not removed by washing of the cultures. It is concluded, therefore, that the cytidine incorporation depends on enzyme systems, different for that of desoxycytidine. Preparatory steps for autoradiography of the cells extracted an appreciable amount of activity, which declined after cessation of the incubation with tritiated cytidine. Some label was obviously also extracted from the chromatin portion of the nucleus.

RNA synthesis stops while the cell is in nitosis as evidenced by the lack of incorporation of tritiated cytidine into dividing cells.

Evidence is presented indicating that the tissue culture cells synthesize RNA, also during DNA synthesis period.

3. Tritiated cytidine is incorporated into DNA during DNA synthesis. Compounds not previously incorporated into DNA during short term in-

cubation with tritiated cytidine were found to be utilized at a later time for DNA synthesis.

4. The majority of the incorporated cytidine is recovered in the RNA. The label in the acid soluble pool declines steadily with time after cessation of incorporation of the labeled cytidine, while H^3 RNA was stabil.

5. It is confirmed for HeLa cells that cytidine is in part converted to thymine for DNA synthesis and uridine for RNA synthesis.

The experimental results lend support to the hypothesis that RNA synthesis begins in the chromatin portion of the nucleus. The fate of the incorporated cytidine apparently is decided in the nucleus, where it is first linked specifically and from where it progresses to the building blocks of nucleolar and cytoplasmic RNA or DNA.

ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DE LA RÉPARTITION DE CERTAINS ENZYMES DANS LES TISSUS UTÉRINS ET PLACENTAIRES CHEZ LES MAMMIFÈRES

M. PANIGEL

Laboratoire de Biologie animale du Collège Scientifique Universitaire de Tours et Laboratoire de Recherche de la Maternité de l'Hôpital Saint Antoine de Paris

Après une révision de la liste des enzymes détectées jusqu'ici dans l'utérus et le placenta, nous envisagerons quelles possibilités offrent les techniques actuelles de l'histochimie pour localiser un certain nombre de ces enzymes dans la muqueuse utérine et les formations placentaires des Mammifères.

Nous étudierons tout particulièrement, tout au long de la gestation, la répartition dans les tissus déciduaux et trophoblastiques, des enzymes appartenant au groupe des estérases (phosphoestérases spécifiques 5-nucléotidase, cholinestérase).

Les données fournies par l'histochimie seront discutées en fonction des questions soulevées par l'étude du métabolisme des glucides, des lipides et des protides ainsi que par les recherches physiologiques sur l'hémodynamique utero- et foeto-placentaire et sur la perméabilité du placenta.

